



Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stefan Reisbacher (geb. Meier)

geboren in Salzkotten

Marburg / Lahn 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 17.09.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2009

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Ergebnisse von Untersuchungen zum Photozyklus von Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana* in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Viana RM, Pokorny R, Ahmad M, Bittl R und Batschauer A (2007). The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J Biol Chem*, 282(20):14916–14922

Bouly JP, Schleicher E, Dionisio-Sese M, Vandenbussche F, Straeten DVD, Bakrim N, Meier S, Batschauer A, Galland P, Bittl R und Ahmad M (2007). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem*, 282(13):9383–9391

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lichtperzeption bei Pflanzen	1
1.2	Phytochrome	1
1.2.1	Signaltransduktion der Phytochrome	2
1.2.2	Lichtabhängige Regulation der Samenkeimung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.3	Die Cryptochrom / Photolyase-Familie	8
1.3.1	Photolyasen	10
1.3.2	Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
1.3.3	Cry DASH / cry3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.3.4	Evolution der Cryptochrom / Photolyase-Familie	24
1.4	Phototropine	26
1.5	Die ZTL-Familie und die Innere Uhr	27
1.6	Entwicklung und Regulation der Chloroplasten	29
1.6.1	Import von Proteinen	29
1.6.2	Genregulation in Plastiden	31
1.7	Zielsetzung	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.1.1	Chemikalien	35
2.1.2	Geräte	35
2.1.3	Oligonukleotide	36
2.1.4	Antikörper	38
2.1.5	Größenmarker	39
2.1.6	Fotomaterialien	39
2.1.7	Plasmide	39
2.1.8	Antibiotika	39
2.1.9	Pflanzenhormone	40
2.1.10	Verwendete Organismen	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Pflanzenanzucht	41
2.2.2	Oberflächensterilisation von Samen	43
2.2.3	Keimungsversuche	43

2.2.4	Bestimmung der Pigmentzusammensetzung	44
2.2.5	Bestimmung der Hypokotylllänge und Kotyledonenfläche	45
2.2.6	Elektronenmikroskopie	45
2.3	Molekularbiologische Methoden	45
2.3.1	Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
2.3.2	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)	45
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
2.3.4	Restriktion von DNA	48
2.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.3.7	Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.3.8	Standard-PCR (Polymerasekettenreaktion)	49
2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.3.10	Isolation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
2.3.11	RNA-Isolation	53
2.3.12	cDNA-Synthese und reverse Transkription	55
2.3.13	<i>realtime</i> PCR	56
2.3.14	Quantifizierung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur	57
2.3.15	Klonierungstechniken	59
2.3.16	Direkter DNA-Transfer in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
2.3.17	<i>Floral dip</i> Methode zur <i>Agrobakterien</i> -vermittelten Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
2.3.18	Selektion von homozygoten transgenen <i>Arabidopsis</i> Linien mit Einzel- insertion	63
2.3.19	<i>Screening</i> der Koncz T-DNA-Kollektion	63
2.4	Proteinbiochemische Methoden	65
2.4.1	Proteinextraktion aus Keimlingen	65
2.4.2	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	65
2.4.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . .	66
2.4.4	Färbung von Acrylamidgelen mit Coomassie	67
2.4.5	<i>Western</i> Transfer auf Nitrocellulosemembranen (Semi Dry Blot)	67
2.4.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen	68
2.4.7	Isolation von Organellen	69

3 Ergebnisse	74
3.1 Lokalisation von Cryptochrom 3	74
3.2 Expression von Cryptochrom 3	76
3.2.1 CRY3 wird lichtabhängig exprimiert	76
3.2.2 Diurnale Expression von <i>CRY3</i>	79
3.3 Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3	80
3.3.1 Transgene Cryptochrom 3 Linien	80
3.3.2 Wachstum und Entwicklung	88
3.3.3 Untersuchungen zur Regulation von Plastidengenen durch cry3	91
3.3.4 Keimung	94
3.3.5 Untersuchung auf eine mögliche Funktion als DNA-Photolyase	100
4 Diskussion	106
4.1 Cryptochrom 3 ist in Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkernen lokalisiert	106
4.2 Die lichtinduzierte Expression von cry3 ist phyA-abhängig	108
4.3 Die <i>CRY3</i> -Expression unterliegt einem diurnalen Rhythmus	111
4.4 Cryptochrom 3 hat keinen offensichtlichen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung	112
4.5 Regulation von Plastidengenen	113
4.6 Ein Einfluss von cry3 auf die Samenkeimung kann nicht völlig ausgeschlossen werden	116
4.7 cry3 <i>knock-out</i> oder Überexpression hat keinen Einfluss auf die DNA-Reparatur unter photoreaktivierenden Bedingungen	118
4.8 Weitere mögliche Funktionen von Cryptochrom 3 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	122
5 Zusammenfassung	125
6 Anhang	147

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter		
µm	Mikrometer	kDa	Kilo Dalton
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>	LFR	<i>low fluence response</i>
A.dest.	destilliertes Wasser	M	mol pro Liter
AK	Antikörper	Mbp	Megabasenpaare
APS	Ammonium Persulfat	min	Minute(n)
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mM	millimolar
B	Blau	MTHF	Methenyltetrahydrofolat
bp	Basenpaare	NAA	<i>naphthaleneacetic acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)	NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
cDNA	complementary DNA	N ₂	Stickstoff
Chl	Chlorophyll	nm	Nanometer
CRY	Cryptochrom-Apoprotein	OD	optische Dichte
cry	Cryptochrom-Holoprotein	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CRY	Wildtyp Cryptochrom-Gen	RNA	Ribonukleinsäure
cry	Mutanten-Allel des Cryptochrom-Gens	rpm	<i>revolutions per minute</i>
DMF	Dimethylformamid	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
DMSO	Dimethylsulfoxid	Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunde(n)
DR	Dunkelrot	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
DTT	Dithiothreitol	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethanhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	U	Unit
EtOH	Ethanol	UV	Ultraviolett
FAD	Flavinadenindinukleotid	VLFR	<i>very low fluence response</i>
FMN	Flavinmononukleotid	w/v	Gewicht/Volumen
g	Gramm	WT	Wildtyp
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	(x) g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GUS	β-Glucuronidase		
h	Stunde(n)		
HIR	Hochintensitätsreaktion		
HR	Hellrot		
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>		
Hz	Hertz		
IgG	Immunglobulin G		

1 Einleitung

1.1 Lichtperzeption bei Pflanzen

Licht stellt nicht nur die primäre Energiequelle für fast alles Leben dar, sondern ist auch ein sehr wichtiger Informationsträger für die meisten Organismen. Besonders die Pflanzen sind als sessile Organismen darauf angewiesen, Informationen über ihre Umwelt zu erhalten. Um zu überleben, müssen sie sich ständig wechselnden Umweltbedingungen anpassen. So stehen Pflanzen zum Beispiel in ständiger Konkurrenz um Ressourcen und müssen ihren Lebenszyklus mit den jahreszeitlichen Veränderungen synchronisieren (Franklin und Whitelam, 2004). Fast alle Entwicklungsprozesse von der Samenkeimung bis zur Blühinduktion werden von Licht gesteuert (Batschauer, 1999). Pflanzen sind in der Lage, die Intensität, die Qualität und die Richtung des Lichts über ein breites Spektrum des sichtbaren Lichts zu messen. Dazu haben sie verschiedene Photorezeptorsysteme entwickelt, die sich in ihrem Absorptionsbereich zum Teil überlappen. Die Cryptochrome und die Phototropine zählen zu den Blaulichtphotorezeptoren und absorbieren Licht im Wellenlängenbereich von 350 bis 500 nm. Die Phytochrome sind für die Wahrnehmung des roten und dunkelroten Lichts (600 bis 800 nm) zuständig, besitzen aber ebenfalls die Fähigkeit, blaues Licht zu absorbieren (Liscum et al., 2003). Photorezeptoren, die für die Absorption von UV-B-Strahlung verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden (Gyula et al., 2003). Außerdem sprechen verschiedene Grünlichteffekte in *Arabidopsis thaliana* für die Existenz eines weiteren bisher unbekannten Grünlicht-spezifischen Photorezeptorsystems (Folta und Maruhnich, 2007).

Die Transduktionskette des Lichtsignals beginnt mit der Absorption des Lichts durch den Chromophor des jeweiligen Photorezeptors und führt zur differentiellen Expression von etwa 8000 Genen in *Arabidopsis thaliana* (Ma et al., 2001). Dies versetzt die Pflanze in die Lage, auf Umweltreize zu reagieren und ihre Physiologie veränderten Bedingungen anzupassen.

1.2 Phytochrome

Die Phytochrome gehören zu den am besten untersuchten pflanzlichen Photorezeptoren. Es wurde bereits sehr früh gezeigt, dass die Samenkeimung durch Rotlicht stimuliert und durch anschließende Exposition mit dunkelrotem Licht wieder inhibiert werden kann (Borthwick et al., 1952). Anhand dieses physiologischen Effekts konnten später die Phytochrome als verantwortliche Photorezeptoren identifiziert werden. Phytochrome werden in *Arabidopsis thaliana* durch eine kleine Multigenfamilie kodiert. Sie besteht aus 5 Mitgliedern, die als Phytochrom A (*PHYA*) bis Phytochrom E (*PHYE*) bezeichnet werden (Sharrock und Quail, 1989; Clack et al., 1994). Die Phytochrome sind große Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa und wurden zunächst nur als Homodimere beschrieben. Von Sharrock und Clack (2004) konnte jedoch auch eine Heterodimerisierung der lichtstabilen Typ II Phytochrome B-E nachgewiesen werden. Jedes Polypeptid ist über seine N-terminale Domäne

kovalent mit dem offenkettigen Tetrapyrrol Phytochromobilin als Chromophor verknüpft. Die C-terminale Domäne der Phytochrome ist für die Dimerisierung und möglicherweise für die Signalweiterleitung verantwortlich (Kevei und Nagy, 2003). Untersuchungen von Matsushita et al. (2003) zeigen jedoch, dass allein die N-terminale Domäne von phyB, wenn sie mit einer Dimerisierungsdomäne und einer NLS (*nuclear localisation sequence*) fusioniert wird, im Zellkern aktiv ist. Auch für die synergistische Interaktion zwischen phyB und den Cryptochromen bei der Regulation der Wurzel-Ergrünung im Blaulicht ist die C-terminale Domäne entbehrlich (Usami et al., 2007). Phytochrome werden im Dunkeln in ihrer physiologisch inaktiven P_r -Form synthetisiert. Nach Absorption von hellrotem Licht wird das Phytochrom in die physiologisch aktive P_{fr} -Form überführt. Diese Reaktion ist durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht beliebig oft revertierbar. Die P_{fr} -Form von phyA wird im Licht abgebaut, weshalb es hauptsächlich in etiolierten Keimlingen vorkommt. Auch die Expression des *PHYA*-Gens wird im Licht unterdrückt. Die übrigen Phytochrome kommen in wesentlich geringerer Konzentration vor und werden vom Licht weniger stark beeinflusst. Bei Pflanzen, die im Licht wachsen, kommt aufgrund des phyA-Abbaus hauptsächlich phyB vor (Übersicht in Schäfer und Bowler, 2002). Es können drei verschiedene Arten der Phytochromantwort unterschieden werden: die VLFR (*very low fluence response*), LFR (*low fluence response*) und die HIR (*high irradiance response*). Phytochrom A ist sowohl für die VLFR, als auch für die HIR, die durch dunkelrotes Licht hoher Intensität und mit langer Bestrahlungszeit induziert wird, verantwortlich. Diese beiden Reaktionen zeigen keine Photoreversibilität, da bereits eine sehr geringe Menge an aktivem phyA in der P_{fr} -Form für eine Signalweiterleitung ausreicht (Übersicht in Nagy und Schäfer, 2002).

Durch die extreme Sensitivität der VLFR wird auch die Keimung von Samen, die tief im Boden liegen, ermöglicht. Bei der Hochintensitätsreaktion unterscheidet man noch zwischen rot- und dunkelrot-induzierter HIR. Obwohl Phytochrom A somit besonders für die Perzeption von dunkelrotem Licht verantwortlich ist, wird eine Vielzahl von Genen, welche nach Rotlichtbestrahlung früh (nach 1 h) induziert werden, von phyA reguliert (Tepperman et al., 2001, 2006). Die anderen Phytochrome (phy B-E) sind für die klassische rot/dunkelrot-reversible LFR verantwortlich (Übersicht in Kevei und Nagy, 2003). Phytochrom B ist unter anderem an der Regulation der Samenkeimung, der Deetiolierung und des Längenwachstums des Sprosses beteiligt. Phytochrom D und E kontrollieren zusammen mit phyB die Schattenmeidungsreaktion (*shade avoidance response*), das Internodienwachstum, sowie den Blühzeitpunkt, während phyE zusätzlich über die dunkelrot vermittelte HIR an der Samenkeimung beteiligt ist (Hennig et al., 2002).

1.2.1 Signaltransduktion der Phytochrome

Die C-terminale Domäne pflanzlicher Phytochrome enthält eine Kinase-Domäne, welche Ähnlichkeiten zu bakteriellen Histidin-Kinasen aufweist, allerdings keine Histidin-Kinase-Aktivität

besitzt. Es wurde gezeigt, dass Phytochrom (phyA) sich selbst phosphorylieren kann und außerdem Substrate wie PKS1 (phytochrome kinase substrate 1) *in vitro* lichtabhängig phosphoryliert (Fankhauser et al., 1999). Mit NDPK2 wurde von Choi et al. (1999) ein weiterer Interaktionspartner der Phytochrome entdeckt. Die Nukleosid-Diphosphat-Kinase 2 bindet die Phytochrome in der P_{fr} -Form, wodurch die Aktivität von rekombinantem NDPK2 gesteigert wird. Zudem zeigt die *ndpk2*-Mutante einige Defekte in rot- und dunkelrotlicht-gesteuerten Prozessen wie der Kotyledonenöffnung und Ergrünung. Die physiologische Relevanz dieser Interaktionspartner und ihre Funktion bei der Signaltransduktion ist jedoch bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt.

Obwohl Phytochrom zunächst nur als cytoplasmatisches Protein beschrieben worden war, findet dennoch ein lichtinduzierter Transport der P_{fr} -Form in den Zellkern statt. Ein Teil des Phytochroms bleibt jedoch im Cytoplasma zurück (Sakamoto und Nagatani, 1996; Kircher et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999). Neben einigen cytoplasmatischen Prozessen, wie der phyA-vermittelten Inhibierung des Gravitropismus oder der Inhibierung des Hypokotylwachstums im Blaulicht (Rösler et al., 2007), regulieren die Phytochrome im Zellkern eine große Anzahl von etwa 2500 lichtgesteuerten Genen. Davon zählen etwa 250 Gene zu den früh reagierenden Genen, wobei für deren Regulation hauptsächlich phyA verantwortlich ist. Bei einem Großteil dieser Gene handelt es sich um Transkriptionsfaktoren (Tepperman et al., 2006). Eine Erklärung für diese schnelle Regulation von vielen unterschiedlichen Genen ist die direkte lichtabhängige Interaktion von aktivem Phytochrom im Zellkern mit den PIF-Proteinen (*Phytochrome Interacting Factor*), wobei es sich um Mitglieder der bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktoren-Familie handelt. PIFs können in einer Unterfamilie der bHLH-Faktoren zusammengefasst werden, wobei in *Arabidopsis* 15 Mitglieder identifiziert werden konnten (Toledo-Ortiz et al., 2003). Eine selektive Interaktion mit der P_{fr} -Form von phyA und phyB wurde zunächst für PIF3 belegt (Zhu et al., 2000; Ni et al., 1999). Durch Sequenzanalysen von *Arabidopsis thaliana* wurden schließlich 5 weitere PIF-Proteine gefunden, welche ebenfalls mit den Phytochromen interagieren. Dabei handelt es sich um PIF1/PIL5, PIF4, PIF5/PIL6, PIF6/PIL2 und PIF7 (Übersicht in Castillon et al., 2007; Leivar et al., 2008a). Auch PIF1 interagiert sowohl mit phyA, als auch mit phyB, wobei sich die Interaktion mit den jeweiligen Proteinen in ihrer Affinität unterscheidet (Huq et al., 2004). Für die restlichen PIF-Proteine konnte dagegen nur eine Interaktion mit der P_{fr} -Form von Phytochrom B nachgewiesen werden. Mit der Ausnahme von PIF7 als lichtstables Protein werden die übrigen PIFs nach der Phytochrom-Interaktion proteasomal abgebaut. Weitere Mitglieder der PIF-Unterfamilie wie z.B. SPT (*spatula*), HFR1 (*long hypocotyl in far-red1*) oder PIL1 interagieren *in vitro* dagegen nicht direkt mit den Phytochromen, obwohl auch diese bHLH-Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Phytochrom-Signaltransduktion spielen (Fairchild et al., 2000; Penfield et al., 2005). Eine Funktion dieser Faktoren in der Phytochrom-Signalkette lässt sich möglicherweise durch die Heterodimerisierung von verschiedenen bHLH-Transkriptionsfaktoren erklären. So können PIFs sowohl Homodimere, wie auch Heterodimere mit anderen PIF-Proteinen oder sogar

mit anderen bHLH-Faktoren wie HFR1 bilden (Übersicht in Josse et al., 2008).

Obwohl die verschiedenen PIFs in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind, zeigen die einzelnen *pif*-Mutanten zum Teil ähnliche, aber auch unterschiedliche Phänotypen. PIF1 ist in *Arabidopsis thaliana* an mehreren physiologischen Prozessen beteiligt. PIF1 reguliert unter anderem die Repression der lichtinduzierten Keimung, die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums und die Chlorophyll-Akkumulation im Licht (Huq et al., 2004; Oh et al., 2004). Die *pif1*-Mutanten akkumulieren bereits im Dunkeln mehr Protochlorophyllid, was zu einer Bleichung von etiolierten Keimlingen führt, sobald sie dem Licht ausgesetzt werden. Auch die Akkumulation von Chlorophyll ist in der *pif1*-Mutante höher als im WT. Somit dient PIF1 unter anderem als negativer Regulator der Chlorophyll-Biosynthese (Huq et al., 2004).

Aus der phänotypischen Analyse von *pif3*-Mutanten konnte für PIF3 auf eine Funktion als negativer Regulator von morphologischen Prozessen im Rotlicht geschlossen werden. Die Chloroplasten-Entwicklung, der Ergrünungsprozess der Keimlinge während der frühen Phase der Deetiolierung und die Anthocyan-Biosynthese scheint dagegen positiv von PIF3 beeinflusst zu werden (Monte et al., 2004; Kim et al., 2003). PIF4, PIF5 und PIF7 wirken ebenfalls als negative Regulatoren der lichtinduzierten Photomorphogenese (Huq und Quail, 2002; Fujimori et al., 2004; Leivar et al., 2008a). Die biologische Funktion von PIF6 ist bisher nicht aufgeklärt.

Neben der Interaktion mit den Phytochromen binden die PIF-Proteine spezifische regulatorische Elemente ihrer Zielgene. Das Sequenzmotiv, mit dem die PIFs interagieren, wird als G-Box bezeichnet und ist durch die Sequenz 5'-CACGTG-3' charakterisiert (Martínez-García et al., 2000). Diese regulatorische Sequenz ist bei vielen lichtregulierten Genen zu finden. Durch *microarray* Analysen konnten viele Gene identifiziert werden, deren frühe Rotlicht-Induktion durch die Mutation des *PIF3*-Gens beeinträchtigt wird (Monte et al., 2004). Bisher konnten jedoch nur wenige direkte Zielgene von PIF1 und PIF3 bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass PIF1 die DELLA-Proteine *GAI* und *RGA* im Dunkeln direkt aktiviert (Oh et al., 2007). Für PIF3 konnte die direkte Interaktion mit den Promotoren von 6 Genen nachgewiesen werden, die an der Anthocyan-Biosynthese beteiligt sind (Shin et al., 2007). Somit ergibt sich ein einfaches Modell, wie die Phytochrome auf direktem Weg die lichtabhängige Genexpression im Zellkern steuern können (Abbildung 1). Im Dunkeln sind die Phytochrome im Cytoplasma lokalisiert, während die PIFs im Zellkern aktiv sind. Die Aktivierung der Genexpression von Genen wie *GAI* und *RGA* durch PIF1 führt zu einer negativen Regulation der Photomorphogenese. Im Licht wird Phytochrom in die P_{fr}-Form überführt und daraufhin in den Zellkern transportiert, wo es zu einer direkten Interaktion der Phytochrome mit den PIFs kommt. Die PIF-Proteine werden dadurch phosphoryliert und nach einer Poly-Ubiquitinierung vom 26 S Proteasom abgebaut. Die negative Regulation der Photomorphogenese wird somit aufgehoben und durch die Reduktion der *GAI*- und *RGA*-Expression wird z.B. die Samenkeimung im Licht stimuliert (Castillon et al., 2007).

Durch die Arbeiten von Feng et al. (2008) und de Lucas et al. (2008) wurde ein weiterer Me-

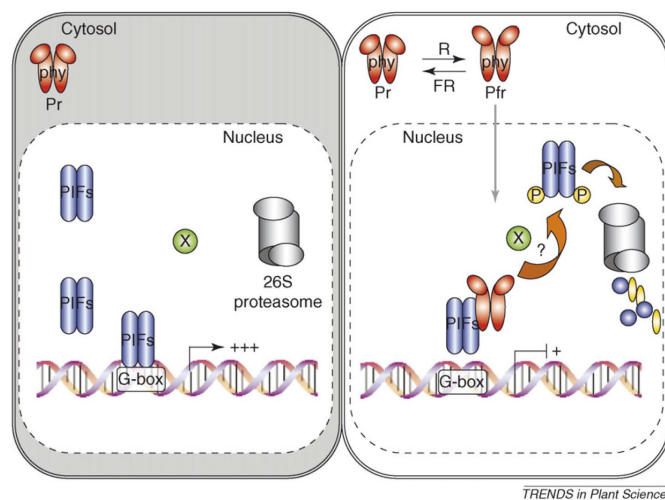


Abbildung 1: Modell der Phytochrom-Signaltransduktion durch PIFs. Abbildung aus Castillon et al. (2007). Links ist eine Zelle in Dunkelheit dargestellt, der rechte Teil der Abbildung zeigt die Signaltransduktion im Licht.

chanismus der PIF-Signaltransduktion aufgedeckt, der die Wachstumsregulation durch Licht und die Wirkung des Phytohormons Gibberellin (GA) miteinander verbindet. PIF3 und PIF4 interagieren direkt mit dem DELLA-Protein RGA, einem wichtigen Repressor der Photomorphogenese. Ein Anstieg der endogenen Gibberellin-Konzentration führt zu einem proteasomalen Abbau der DELLA-Proteine, wodurch eine Vielzahl an Genen für die Photomorphogenese aktiviert wird. Entgegen den bisherigen Annahmen werden die Zielgene anscheinend nicht direkt durch die DELLAs reguliert, da bisher keine direkte Interaktion mit den Promotoren der GA-regulierten Gene nachgewiesen werden konnte (Feng et al., 2008). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die DELLA-Proteine in Abwesenheit von GA mit den PIFs interagieren und dadurch die Funktion der PIF-Proteine als Transkriptionsfaktoren blockieren. Ein Anstieg der GA-Konzentration führt demnach zum Abbau der DELLA-Proteine, was die PIFs wieder in die Lage versetzt, die Promotoren von verschiedenen Genen, die an der Steuerung der Entwicklung beteiligt sind, zu binden und deren Expression zu regulieren.

Untersuchungen von Leivar et al. (2008a) und Al-Sady et al. (2008) deuten auf einen weiteren PIF-abhängigen Mechanismus zur Regulation des Hypokotylwachstums bei Langzeitbestrahlung hin. Die Autoren postulieren für PIF3, PIF4 und PIF7 unterschiedliche Reaktionsmechanismen für die frühe positive Wirkung auf Transkription und Ergrünung und die späte Antwort auf Dauer-Rotlicht zur Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums. Während PIF3 in der frühen Phase der Deetiolierung als konventioneller Transkriptionsfaktor wirkt und an den Phytochrom-induzierten Änderungen der Genexpression beteiligt ist, so scheint die negative Regulation des Hypokotylwachstums durch die PIF-induzierte posttranskriptionelle Regulation der Phytochrom B-Konzentration selbst verursacht zu werden. Die Interaktion zwischen PIF3 und phyB führt demnach bei Langzeit-Rotbestrahlung zu einer Degradation des Photorezeptors Phytochrom B, ähnlich wie es in der frühen Phase auch für die PIFs beschrieben

ist. Dadurch wird die Sensitivität des Phytochromsystems reduziert, was schließlich zu einer negativen Regulation der Photomorphogenese führt.

Im Dunkeln bewirken die PIFs eine Aktivierung verschiedener Gene, die eine frühzeitige Photomorphogenese der Pflanzen verhindert. Diese Repression der Entwicklung wird durch den Phytochrom-induzierten Abbau der PIFs aufgehoben (Leivar et al. 2008b). Da die Aktivität der PIFs als Transkriptionsfaktoren somit nicht durch Licht reguliert wird, erklären Al-Sady et al. (2008) die transiente Induktion der frühen Phytochrom-induzierten Gene mit einem weiteren, bisher unbekannten positiven Transkriptionsfaktor, der durch Licht aktiviert wird. Nur die Aktivität beider Faktoren führt demnach zur Induktion der Genexpression (Abbildung 34). Trotz der vielen Fortschritte auf dem Gebiet der Phytochrom-Signaltransduktion ist die Rolle der PIF-Proteine also noch immer nicht vollständig aufgeklärt und es bleiben noch einige Fragen offen.

1.2.2 Lichtabhängige Regulation der Samenkeimung von *Arabidopsis thaliana*

Durch die Regulation der Samenkeimung bestimmen die Pflanzen den Zeitpunkt ihres Wachstums und sie stellt somit eine wichtige Überlebenstrategie dar. Die Samenkeimung wird von vielen Umweltfaktoren wie Feuchtigkeit, Temperatur, Licht und Nährstoffen reguliert, wobei Licht besonders bei Pflanzen mit kleinen Samen, wie z.B. *Arabidopsis*, eine große Rolle spielt. Das Licht dient den Samen dazu, ihre Position in der Erde wahrzunehmen. Falls diese Samen zu tief im Erdboden keimen, reichen die Nährstoffvorräte der kleinen Samen möglicherweise nicht aus, damit der Keimling die Oberfläche erreichen kann (Seo et al., 2009).

Die bedeutende Rolle von Licht bei der Samenkeimung einiger Pflanzen wurde bereits 1952 von Borthwick et al. beschrieben, aber erst später wurden die Phytochrome A, B und E als verantwortliche Photorezeptoren für diese Reaktion identifiziert (Shinomura et al., 1996, 1994; Hennig et al., 2002). Während phyA bezüglich der Keimung für die VLFR und DR-HIR Reaktionen zuständig ist, wird die reversible LFR hauptsächlich durch phyB reguliert. Auch für phyE konnte eine Beteiligung an der LFR und der DR-HIR gezeigt werden (Hennig et al., 2002). Die Aktivierung dieser Phytochrome führt zu nachfolgenden Prozessen, die die Keimung der Samen ermöglichen. Bei der Keimung spielen die beiden antagonistischen Hormone Gibberellin (GA) und Abscisinsäure (ABA) eine zentrale Rolle. Die induktive Rolle von GA und die inhibierende Wirkung von ABA auf die Samenkeimung ist schon seit langer Zeit bekannt (Kahn et al., 1957; Sondheimer et al., 1968). In letzter Zeit wurden große Fortschritte beim Verständnis der Wirkung von Licht auf die GA- und ABA-Regulation auf molekularer Ebene gemacht. Neben der Samenkeimung sind die Gibberelline zudem an der Blattentwicklung, dem Längenwachstum und der Blühinduktion beteiligt. ABA spielt zusätzlich zur Kontrolle der Samenruhe eine große Rolle bei der Regulation des Wasserhaushaltes in der Pflanze.

Gibberelline sind Diterpene, deren Biosynthese vom Geranylgeranyldiphosphat ausgeht. Die ersten Schritte der Synthese bis zum *ent*-Kauren finden in den Plastiden statt. In Pflanzen

wurden bisher mehr als 100 verschiedene GAs entdeckt, wovon jedoch nur wenige, wie GA₁ und GA₄, als bioaktive Hormone wirken. Die endogene Konzentration der aktiven GAs wird nicht nur durch ihre Syntheserate bestimmt, sondern auch die enzymatische Umwandlung in biologisch inaktive Formen dient der Regulation der Hormonkonzentration (Lange und Lange, 2006). Weitere Schritte der GA-Biosynthese werden von GA20-Oxidasen (GA20ox) und den GA3-Oxidasen (GA3ox) katalysiert, wobei die GA3-Oxidasen den letzten Schritt zum bioaktiven Gibberellin synthetisieren. GA20ox und GA3ox sind durch eine kleine Multigenfamilie mit jeweils 5 bzw. 4 Mitgliedern kodiert. Am Abbau des aktiven Gibberellins sind unter anderem die GA2-Oxidasen, welche ebenfalls durch eine kleine Multigenfamilie kodiert werden, beteiligt. Die phytochromabhängige Lichtregulation der Samenkeimung erfolgt teilweise durch die transkriptionelle Regulation dieser GA-Metabolismusgene. Als wichtiger Faktor, der die Perzeption der Lichtsignale mit dem GA-Metabolismus verbindet, wurde PIF1 identifiziert (Oh et al., 2004). In Dunkelheit wirkt PIF1, indem es durch Repression der Transkription der GA3-Oxidase-Gene GA3ox1 und GA3ox2 sowie durch Aktivierung des GA2ox2-Gens die Konzentration des bioaktiven GAs in den Samen herabsetzt. Im Licht führt die Aktivierung von Phytochrom schließlich zum Abbau von PIF1, wodurch diese Kontrolle der GA-Biosynthesegene aufgehoben wird und die GA-Konzentration in den Samen ansteigt (Oh et al., 2006).

Nicht nur der GA-Metabolismus wird durch Licht reguliert, sondern auch die endogene ABA-Konzentration in den Samen wird durch PIF1 lichtabhängig gesteuert. Die ABA-Biosynthesegene ABA1, NCED6 und NCED9 werden im Gegensatz zu den GA-Biosynthesegenen jedoch durch Rotlichtbestrahlung herunterreguliert, während das Gen des ABA-abbauenden Enzyms CYP707A2 aktiviert wird (Seo et al., 2006; Oh et al., 2007; Abbildung 2). So verringert sich im Licht die endogene ABA-Konzentration in den Samen, wodurch die Samenkeimung ermöglicht wird. PIF1 ist also an der reziproken Regulation der Expression der GA- und ABA-Metabolismusgene beteiligt. Durch Chromatin-Immunopräzipitations-Analysen konnte der Nachweis erbracht werden, dass PIF1 nicht direkt mit den Promotoren der GA- und ABA-Metabolismusgene interagiert (Oh et al., 2007). Diese Gene werden somit indirekt durch einen weiteren Faktor von PIF1 reguliert. Bei diesem Faktor handelt es sich möglicherweise um das kürzlich identifizierte SOM-Protein, einem CCCH-Typ *zinc finger protein*, welches vermutlich RNA-bindende Eigenschaften besitzt. SOM ist ein direktes Zielgen von PIF1 und reguliert die GA- und ABA-Metabolismusgene stromabwärts von PIF1 (Kim et al., 2008).

Neben der Regulation der GA- und ABA-Metabolismusgene durch Licht gibt es auch eine direkte Interaktion zwischen dem GA-Metabolismus und dem ABA-Metabolismus. Die bioaktive GA-Konzentration wird bei der Samenkeimung durch ABA negativ reguliert (Seo et al., 2006). Diese Regulation beruht offenbar ebenfalls auf einer veränderten Expression der GA-Metabolismusgene. Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass durch GA die endogene ABA-Konzentration negativ reguliert wird (Oh et al., 2007). Der genaue Mechanismus dieser reziproken Regulation der beiden antagonistischen Hormone ist bisher noch nicht vollständig

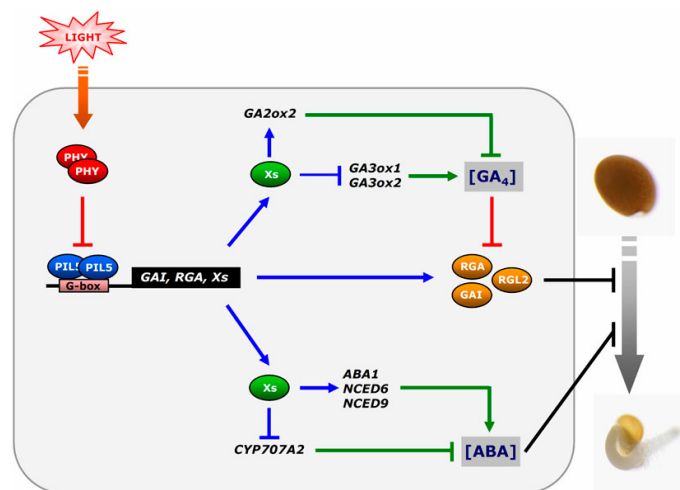


Abbildung 2: Schema zur Regulation der Samenkeimung. Abbildung aus Oh et al. (2007).

aufgeklärt. Diese zusätzliche Art der Regulation würde als Antwort auf ein Lichtsignal eine effiziente Veränderung des Verhältnisses der beiden Hormone erlauben. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass die Keimung nicht durch die absolute Menge eines einzelnen Hormons, sondern durch das Verhältnis von GA und ABA bestimmt wird. Diese Hypothese wurde bereits vor längerer Zeit von Koornneef et al. (1982) aufgestellt, da ABA-Mutanten als Suppressoren von keimungsunfähigen GA-Mutanten dienen.

Als negative Regulatoren in der GA-Signaltransduktion wurden die DELLA-Proteine identifiziert. In Anwesenheit von GA interagiert der GA-Rezeptor GID1 mit den DELLA-Proteinen, woraufhin das F-Box-Protein SLY1 an diesen Komplex bindet und die DELLAs durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert werden (Seo et al., 2009). Der Abbau der DELLAs bewirkt schließlich die Aktivierung der GA-abhängigen Antworten. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, konnte im Gegensatz zu den Hormon-Metabolismusgenen, die nur indirekt durch PIF1 reguliert werden, für die beiden DELLA-Proteine *RGA* und *GAI* eine direkte Interaktion mit PIF1 gezeigt werden (Oh et al., 2007). PIF1 bindet dabei an die G-Box-Elemente der Promotoren dieser beiden Zielgene. Im Licht wird somit durch den phytochromabhängigen Abbau von PIF1 die Transkription von *RGA* und *GAI* reduziert, was letztendlich zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Gibberellin führt und die Samenkeimung fördert.

1.3 Die Cryptochrom / Photolyase-Familie

Die Cryptochrom / Photolyase-Familie ist eine große Gen-Familie, welche für Flavin-haltige Proteine mit DNA-Reparaturfunktion (Photolyasen) oder Photorezeptorfunktion (Cryptochrome) kodiert. Während die Photolyasen kurzwelliges Blau- / UV-A-Licht zur Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden nutzen, wird dieses Lichtsignal von den Cryptochromen perzipiert,

um vielfältige Entwicklungs- und Anpassungsprozesse zu steuern. Cryptochrome besitzen also trotz einer großen strukturellen Ähnlichkeit zu den Photolyasen in der Regel keine Photolyaseaktivität (Übersicht in Sancar, 2003). Ihren Namen haben die Cryptochrome erhalten, weil die molekulare Natur der Blaulichtrezeptoren für lange Zeit unbekannt ("cryptisch") war. Außerdem waren die Blaulichtantworten vor allem bei der Gruppe der Cryptogamen beobachtet worden. Die Cryptochrome waren zunächst nur über ihr Aktionsspektrum in Pflanzen charakterisiert, welches zwei Maxima bei 320-400 nm und 400-500 nm aufweist (Senger, 1980). Cryptochrome kommen jedoch nicht nur in Pflanzen, sondern auch in tierischen Organismen, wie Insekten, Fischen, Amphibien und Säugetieren vor (Lin und Shalitin, 2003). Tierische Cryptochrome sind vor allem als Photorezeptoren an der Lichtregulation der Inneren Uhr beteiligt und wurden bei Säugetieren als zentrale Komponente der Inneren Uhr identifiziert (Übersicht in Cashmore, 2003). Cryptochrome scheinen jedoch bei Tieren nicht nur an der Blaulichtperzeption beteiligt zu sein. Auch die Wahrnehmung des Erdmagnetfeldes scheint bei Zugvögeln durch Cryptochrom vermittelt zu werden, indem die lichtabhängige Bildung eines Radikal-Paares durch das Magnetfeld beeinflusst wird (Ritz et al., 2000; Mouritsen und Ritz, 2005; Ritz et al., 2009). Darüber hinaus wurde vor kurzem auch bei der Fruchtfliege *Drosophila* eine Cryptochrom-abhängige Magnetfeldsensitivität nachgewiesen (Gegear et al., 2008). Neben den pflanzlichen und tierischen Cryptochromen wurde durch Sequenzvergleiche in photosynthetischen Cyanobakterien mit den DASH-Cryptochromen eine dritte Unterfamilie identifiziert (Hitomi et al., 2000; Brudler et al., 2003). Somit kommen die Cryptochrome entgegen vorherigen Annahmen auch in prokaryotischen Organismen vor. Zudem wurden DASH-Cryptochrome in weiteren Organismen wie Pflanzen, Tieren und Pilzen nachgewiesen (Daiyasu et al., 2004; Kleine et al., 2003). In dem Pilz *Aspergillus nidulans* wurde mit cryA vor kurzem ein Mitglied der Cryptochrom / Photolyase-Familie entdeckt, welches sowohl eine Photolyasefunktion, als auch eine Cryptochromfunktion aufweist. CryA inhibiert in *A. nidulans* unter anderem die Transkription von Regulatoren der sexuellen Entwicklung (Bayram et al., 2008).

Die meisten Cryptochrome bestehen aus zwei Domänen, wobei nur die PHR-Domäne (*photolyase related*) eine große Sequenzähnlichkeit zu den Photolyasen aufweist. Diese Domäne der Cryptochrome trägt ebenso wie die Photolyasen zwei lichtabsorbierende Chromophore. Während der FAD-Cofaktor (Flavinadenindinukleotid) bei allen Mitgliedern dieser Genfamilie zu finden ist, können sie sich hinsichtlich der Zusammensetzung des zweiten Cofaktors unterscheiden. Bei den Cryptochromen wurde bisher nur MTHF (Methenyltetrahydrofolat) als zweites Antennenpigment gefunden (Abbildung 3 B). Bei unterschiedlichen Photolyasen kann dagegen neben MTHF auch 8-HDF (8-Hydroxydeazaflavin), FMN (Flavinmononukleotid) sowie FAD als Antennenpigment dienen (Essen, 2006). Die C-terminale Domäne, die im Gegensatz zu den Photolyasen bei den meisten Cryptochromen vorhanden ist, ist weniger gut konserviert und ist in ihrer Länge bei den verschiedenen Cryptochromen sehr variabel (Abbildung 3 B). So besitzt SaPHR aus *Sinapis alba* keine C-terminale Extension, ist in ihrer

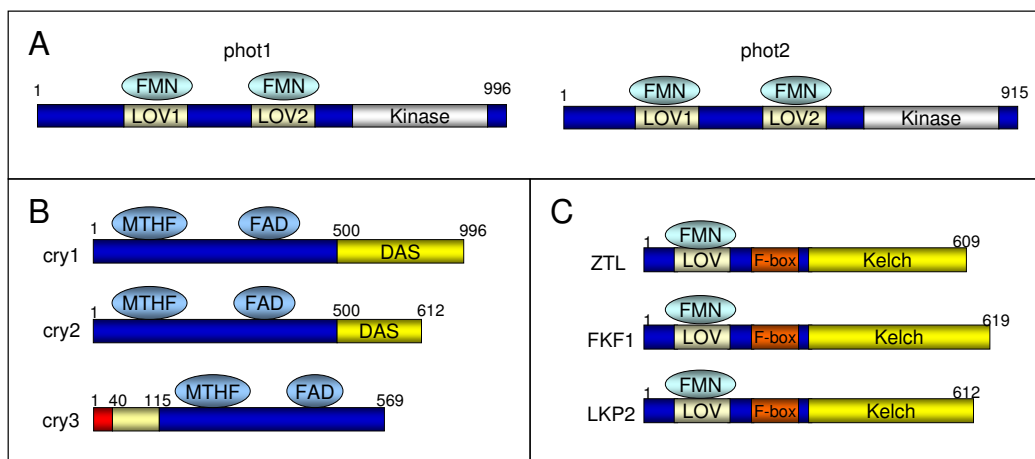


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Blaulichtrezeptoren aus *Arabidopsis thaliana*. (A) PHOT1 und PHOT2 sind Phototropine. N-terminal sind über die LOV-Domänen je 1 FMN gebunden. Der C-Terminus enthält eine Ser/Thr Kinase Domäne. (B) Die Cryptochrome besitzen jeweils ein FAD und ein MTHF als Chromophor. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen in den Proteinen an. Der in Blau markierte Bereich hat hohe Sequenzidentität mit den Photolyasen. Der gelb markierte Bereich repräsentiert die C-terminale Extension mit dem in pflanzlichen Cryptochromen konserviertem DAS Motiv. (C) Zeitlupe-Familie mit den 3 Vertretern in *Arabidopsis* ZTL, FKF1 und LKP2. Diese Proteine haben drei konservierte Domänen für Chromophor-Bindung (LOV), Proteininteraktion (Kelch-repeat) und Interaktion für abzubauen Proteine (F-box).

Aminosäuresequenz aber zu 95% mit der PHR-Domäne von At-cry2 identisch (Batschauer, 1993; Malhotra et al., 1995). Dennoch gibt es drei konservierte Motive, die sich in den C-terminalen Domänen der meisten pflanzlichen Cryptochrome finden lassen. Es handelt sich dabei um das DQXVP-Motiv, ein Motiv mit 3-5 sauren Aminosäuren (Glutamat oder Asparat) und das STAES-Motiv. Da diese drei Motive in ihrer Reihenfolge hoch konserviert sind, werden sie auch häufig als DAS-Domäne (**DQXVP-acidic-STAES**) zusammengefasst. Genetischen Untersuchungen zufolge ist die DAS-Domäne wichtig für die zelluläre Lokalisation, die intermolekularen Interaktionen und die physiologische Funktion der Cryptochrome (Lin und Shalitin, 2003).

1.3.1 Photolyasen

UV-Strahlung verursacht DNA-Schäden, die unter anderem durch eine Beeinträchtigung von Replikation und Transkription einen schädlichen oder sogar tödlichen Einfluss auf lebende Organismen haben kann. Durch UV-Bestrahlung entstehen hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) oder das (6-4)-Photoprodukt, wobei die CPD-Schäden mit etwa 75% die häufigsten UV-induzierten DNA-Läsionen ausmachen. CPDs entstehen durch die UV-induzierte Zyklisierung zweier benachbarter Pyrimidinbasen, bei denen es sich meistens um Thymine handelt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substrate unterscheidet man zwei Arten von Photolyasen. Die CPD-Photolyase ist für die Reversion von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren zuständig, während die (6-4)-Photolyase Pyrimidin-Pyrimidin (6-4)-Photoprodukte repariert (Übersicht in Sancar, 2003; Essen und Klar, 2006). Die CPD-Photolyasen werden

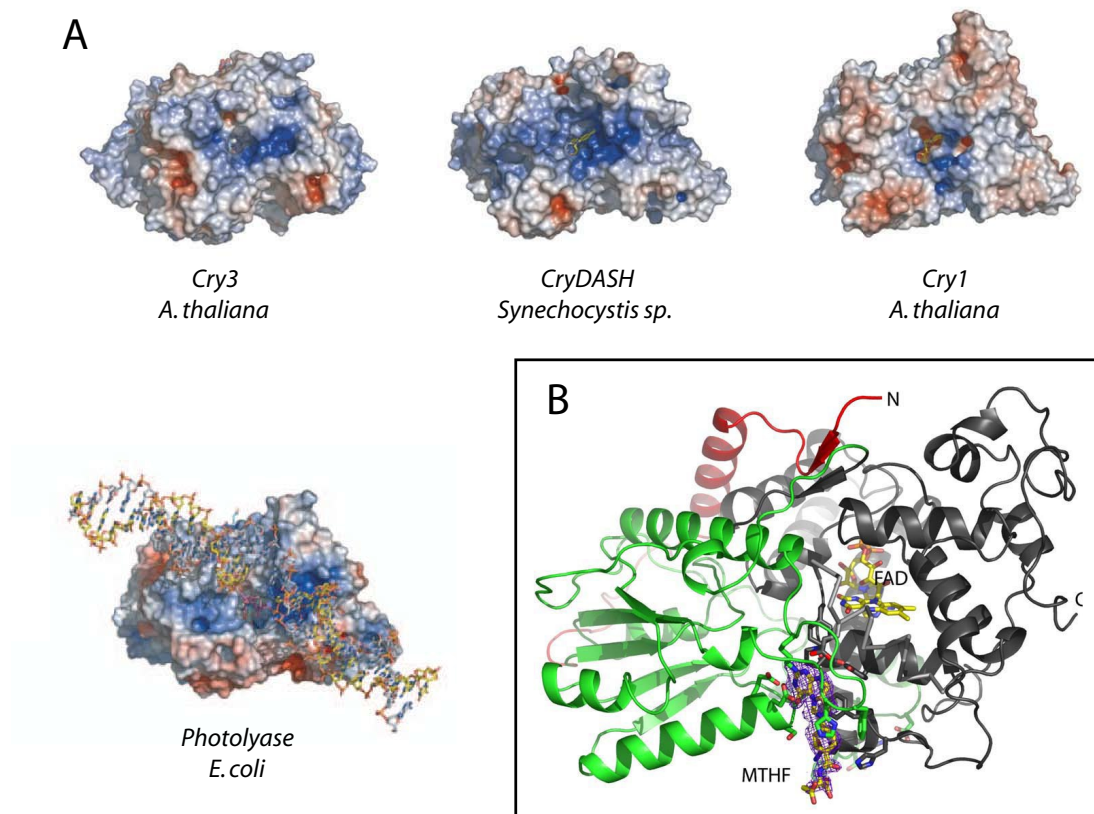


Abbildung 4: Kristallstrukturen verschiedener Mitglieder der Cryptochrom/Photolyase-Familie. Abbildungen verändert aus Klar et al. (2007) und Essen (2006). (A) Elektrostatische Oberflächendarstellung von cry3 aus *Arabidopsis thaliana*, CryDASH aus *Synechocystis sp.*, cry1 aus *Arabidopsis thaliana* (PHR-Domäne) und der CPD-Photolyase aus *E. coli* (Darstellung mit gebundenem DNA-Duplex). Positives und negatives elektrostatisches Potential ist jeweils durch blau bzw. rot dargestellt. (B) Struktur-Darstellung von *Arabidopsis cry3*. Die N-terminale α/β -Domäne ist in grün dargestellt, die FAD-bindende α -helikale Domäne in grau und die N-terminale Extension in rot.

anhand von Sequenzunterschieden nochmals in Klasse I und Klasse II Photolyasen unterteilt, wobei die Klasse I Photolyasen hauptsächlich in prokaryotischen Organismen und einzelligen Eukaryoten vorkommen und Klasse II Photolyasen in Eukaryoten zu finden sind. In *Arabidopsis* ist z.B. eine (6-4)-Photolyase sowie eine CPD-Photolyase des Klasse II Typs vorhanden (Ahmad et al., 1997; Nakajima et al., 1998; Kleiner et al., 1999a).

Die Kristallstrukturen der Photolyasen aus *Escherichia coli* (*E. coli*), *Anacystis nidulans* und *Thermus thermophilus* sind schon seit längerer Zeit aufgeklärt (Park et al., 1995; Tamada et al., 1997; Komori et al., 2001). Diese Photolyasen und die PHR-Domäne von Cryptochrom 1 aus *Arabidopsis* der Cryptochrome weisen eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit auf. Die Photolyasen sind aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen α/β -Domäne und einer C-terminalen α -helikalen Domäne. Beide Domänen sind durch eine lange *loop*-Struktur miteinander verbunden. Die α/β -Domäne ist dabei an der Bindung des Antennenpigmentes MTHF (bei der *E. coli* Photolyase) beteiligt. Der MTHF-Cofaktor sitzt in einer Spalte zwischen N- und C-terminaler Domäne. Der katalytische FAD-Cofaktor ist dagegen tief in der α -helikalen

Domäne verborgen und ist dem äußeren Medium nur durch eine kleine Öffnung zugänglich. Die Proteinoberfläche um diese Öffnung herum weist eine positiv geladene Furche auf, die für die Erkennung und Bindung des DNA-Substrates sehr wichtig ist (Abbildung 4 A, Übersicht in Sancar, 2003).

Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyasen Die Erkennung und Bindung des Thymin-Dimers durch die Photolyase erfolgt zunächst als lichtunabhängiger Prozess. Die DNA-Bindung ist zudem sequenzunabhängig und wird vermutlich in der Erkennungsphase nur über das Phosphoribose-Rückgrat der DNA vermittelt. Ein Thymin-Dimer verursacht eine leichte Verformung der DNA-Struktur von ca. 22° und eine Entwindung der DNA um 9° (Park et al., 2002). Diese Änderung der DNA-Struktur wird von der Photolyase erkannt und es kommt zu einer Interaktion der positiv geladenen Furche an der Proteinoberfläche mit den negativ geladenen Phosphatresten der DNA. Diese Interaktionen führen zu einem "flip out" des Thymin-Dimers, so dass sich das Dimer aus der DNA-Doppelhelix herausdreht und dann fest in der Öffnung des katalytischen Zentrums der Photolyase und somit in unmittelbarer Nähe des FAD-Cofaktors gebunden wird (Mees et al., 2004). Neben doppelsträngiger DNA bindet und repariert die Photolyase auch einzelsträngige DNA mit vergleichbarer Effizienz, Uracil-Dimere in RNA-Strängen werden dagegen von der Photolyase wesentlich schlechter repariert als DNA-Sequenzen (Sancar, 2003).

Im nächsten Schritt erfolgt die Reparatur des CPD-Schadens durch den lichtabhängigen Elektronentransfer vom reduzierten FADH^- auf das Thymin-Dimer. Der Reparaturmechanismus ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Licht einer Wellenlänge von 350-450 nm wird in der Regel zunächst vom Antennenpigment, im Falle der *E. coli* Photolyase dem MTHF, absorbiert. Durch den im Vergleich zum MTHF geringeren Extinktionskoeffizienten erfolgt eine direkte Absorption durch das FADH^- dagegen mit einer wesentlich geringeren Effizienz. Die Anregungsenergie wird vom Antennenpigment durch einen Förster-Mechanismus strahlungslos an den vollständig reduzierten FADH^- -Cofaktor übertragen. Das angeregte FADH^- überträgt ein Elektron auf das Pyrimidin-Dimer, was letztlich zur Spaltung des Cyclobutanrings führt (Abbildung 5). Nach der Reversion des Thymin-Dimers wird das Elektron wieder an das semi-reduzierte FADH^\bullet übertragen, so dass der FAD-Cofaktor wieder vollständig regeneriert wird und in der reduzierten FADH^- -Form für weitere katalytische Zyklen zur Verfügung steht (Übersicht in Sancar, 2003; Essen und Klar, 2006).

Neben der DNA-Reparatur von UV-Schäden kann man bei den Photolyasen eine zweite Lichtabhängige Reaktion beobachten, die sogenannte Photoaktivierung oder Photoreduktion. Dabei wird das Flavin von einem oxidierten oder semi-reduzierten Zustand durch Lichteinwirkung in den vollständig reduzierten und katalytisch aktiven Zustand überführt. Die Elektronen stammen dabei von einem externen Reduktionsmittel, werden aber nicht direkt an den verborgenen FAD-Cofaktor übertragen. Der Elektronentransfer erfolgt vielmehr über drei konservierte Tryptophane der C-terminalen Domäne. Die Elektronen werden somit von der Proteinoberflä-

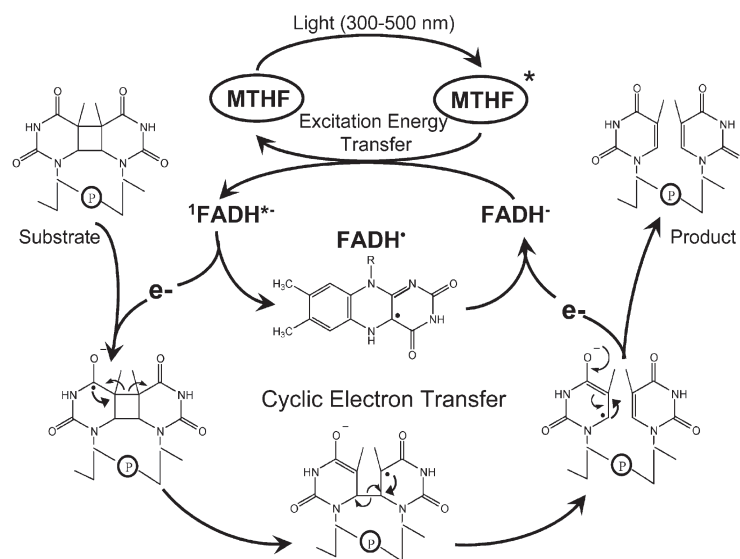


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus einer CPD Photolyase. Abbildung aus Sancar (2003).

che an das FAD weitergeleitet (Cheung et al., 1999; Aubert et al., 1999; Byrdin et al., 2003). Diese Reaktion scheint für die katalytische Funktion der Photolyase *in vivo* jedoch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Selbst wenn der Elektronentransport zur Photoreduktion des Cofaktors durch Mutation unterbrochen wird, ist die Photolyase immer noch in der Lage, viele Reparaturzyklen durchzuführen, bevor sie ihre Aktivität verliert (Kavakli und Sancar, 2004). Ob dieser Elektronentransfer für die Erhaltung des reduzierten Zustandes der Flavino-Cofaktoren also auch *in vivo* von Bedeutung ist, bleibt weiterhin offen (Sancar, 2003). Zumindest ist dieser Mechanismus der Photoreduktion auch bei den verwandten Cryptochromen konserviert und spielt bei den Blaulichtrezeptoren eine zentrale Rolle der Signaltransduktion.

1.3.2 Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*

Cryptochrome sind im gesamten Reich der Pflanzen weit verbreitet und wurden in vielen höheren Pflanzen, Farnen, Algen und Moosen nachgewiesen (Ninu et al., 1999; Matsumoto et al., 2003; Kanegae und Wada, 1998; Small et al., 1995; Imaizumi et al., 2002). Die Anzahl der verschiedenen Cryptochrom-Gene in den einzelnen Organismen ist dabei sehr variabel. In *Arabidopsis thaliana* gibt es neben cry3 als Mitglied der cryDASH-Familie zwei "klassische" Cryptochrome mit der Bezeichnung cry1 und cry2.

Das *CRY1*-Gen wurde 1993 aus der *hy4*-Mutante, welche in der blaulichtregulierten Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums beeinträchtigt ist, isoliert (Ahmad und Cashmore, 1993). Cryptochrom 1 hat 681 Aminosäuren und weist eine Sequenzähnlichkeit von 30% zur *E.coli* Klasse I DNA-Photolyase auf. Später konnte auch das *CRY2*-Gen aus *Arabidopsis* isoliert werden (Hoffman et al., 1996), welches zuvor bereits aus *Sinapis alba* kloniert wurde (Batschauer, 1993), ohne dass dessen Photorezeptorfunktion zu diesem Zeitpunkt bekannt

war. Dieses Gen kodiert für ein Protein von 612 Aminosäuren. Die N-terminale PHR-Domäne (AS 1-500) von cry2 ist zu 58% mit der PHR-Domäne von cry1 identisch, die Sequenzähnlichkeit ihrer C-terminalen Domäne beträgt dagegen nur 14% (Lin, 2002). Trotz dieser geringen Ähnlichkeit in der C-terminalen Domäne besitzen beide Cryptochrome das zuvor erwähnte DAS-Motiv in ihrer C-terminalen Domäne (Abbildung 3 B). Als Cofaktoren konnte in rekombinantem cry1 und cry2 sowohl FAD, als auch MTHF nachgewiesen werden (Lin et al., 1995; Malhotra et al., 1995). Beide Proteine besitzen keine Photolyaseaktivität, obwohl sie die gleichen Chromophore tragen wie die *E. coli* Photolyase (Lin et al., 1995; Malhotra et al., 1995; Hoffman et al., 1996).

Abgesehen von den cryDASH-Proteinen aus *Synechocystis* und *Arabidopsis* konnte bisher nur die Kristallstruktur der PHR-Domäne von *Arabidopsis* cry1 bestimmt werden (Brautigam et al., 2004). Die dreidimensionale Struktur der cry1-PHR-Domäne weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu den CPD-Photolyasen auf. Auch die Cryptochrom-PHR-Domäne ist wie die Photolyase in zwei Sub-Domänen unterteilt, eine α/β -Domäne und eine α -helikale Domäne, welche für die Bindung des FAD-Cofaktors verantwortlich ist. Der Cofaktor weist dabei die gleiche U-förmige Konformation wie bei den Photolyasen auf. Die Tasche, in der sich der FAD-Cofaktor befindet, ist im Vergleich zu den Photolyasen jedoch größer und tiefer und bindet kein Pyrimidin-Dimer, sondern wurde bei cry1 als Ort der ATP-Bindung identifiziert. Als weiteren Unterschied zu den Photolyasen weist cry1 keine positiv geladene Furche im Bereich der FAD-Bindestelle auf (Abbildung 4 A), was gegen eine direkte Interaktion von cry1 mit DNA spricht.

Subzelluläre Lokalisation und Expression von cry1 und cry2 Für Cryptochrom 2 konnte durch Zellfraktionierung und Lokalisationsstudien von GUS- und GFP-Fusionen eine konstitutive Kernlokalisierung gezeigt werden (Guo et al., 1999; Kleiner et al., 1999b). Durch GFP-Analysen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass cry2 im Dunkeln zwar gleichmäßig im Kern verteilt ist, dass es durch Blaulichtbestrahlung jedoch zu einer *speckle*-Bildung des cry2-GFP kommt, welches mit den phyB *speckles* kolokalisiert ist (Más et al., 2000). Cry1 ist dagegen im Dunkeln zwar auch im Zellkern angereichert, im Licht scheint dieses Protein jedoch hauptsächlich im Cytoplasma vorzuliegen (Yang et al., 2000). Da die DNA-Photolyase ebenfalls ein nukleäres Protein ist, liegt die Vermutung nahe, die PHR-Domäne der Cryptochrome trage die Signalsequenz zum Kernimport. Die C-terminalen Domänen von cry1 und cry2 sind jedoch völlig ausreichend für den Kernimport der Proteine (Guo et al., 1999; Kleiner et al., 1999b; Yang et al., 2000). Bei Cryptochrom 2 konnte innerhalb der DAS-Domäne im C-Terminus eine Kernlokalisationssequenz identifiziert werden, die bei cry1 nicht vorhanden ist. GFP-Fusionen mit dem C-Terminus von cry2 sind zudem mit den Chromosomen assoziiert (Cutler et al., 2000). Es ist jedoch unklar, ob es sich um eine Interaktion mit der DNA oder mit anderen DNA-assoziierten Proteinen handelt (Lin und Shalitin, 2003).

Die mRNA von Cryptochrom 1 und 2 wird lichtunabhängig in allen Organen der Pflanze expri-

miert (Übersicht in Lin und Shalitin, 2003). Durch DNA *microarray* Analysen von Harmer et al. (2000) konnte eine Oszillation des mRNA-Gehalts von *CRY1* und *CRY2* im circadianen Rhythmus nachgewiesen werden. Die Expressionsmaxima von *CRY1* und *CRY2* treten jedoch zu unterschiedlichen Zeiten auf. Die *CRY1*-Transkriptmenge erreicht bereits am frühen Morgen ein Maximum, der mRNA-Gehalt von *CRY2* ist dagegen am späten Abend am höchsten. Die Amplitude dieser Expressionsschwankungen ist allerdings relativ gering. Die Expression von *cry2* wird primär auf der Proteinebene reguliert. Während *cry1* als lichtstabil beschrieben wurde (Lin et al., 1998; Ahmad et al., 1998a), wird *cry2* nach Blaulichtbestrahlung abgebaut. Bei Bestrahlung von etiolierten Keimlingen mit $20\text{--}30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht sinkt die *cry2*-Menge innerhalb einer Stunde auf ein Zehntel der Ausgangsmenge (Ahmad et al., 1998a; Lin et al., 1998; Shalitin et al., 2002). Im Kurztag unterliegt die Protein-Expression von *cry2* einem diurnalen Zyklus. Die *cry2*-Menge ist am Ende der Dunkelperiode am höchsten. Bei Anzucht im Langtag ist ein solcher Zyklus nach Untersuchungen von El-Assal et al. (2001) kaum erkennbar. Cryptochrom 2 wird nach Blaulichtbestrahlung nach einer Ubiquitinierung im Zellkern durch das 26 S-Proteasom abgebaut (Yu et al., 2007). Dem induzierten Abbau von *cry2* geht eine lichtabhängige Phosphorylierung des Proteins im Zellkern voraus (Yu et al., 2007; Shalitin et al., 2002). Auch Cryptochrom 1 wird nach Blaulichtbestrahlung phosphoryliert, jedoch wird das phosphorylierte *cry1* nicht wie *cry2* abgebaut. Die Phosphorylierung von *cry1* nach Blaulichtbestrahlung nimmt dagegen im Dunkeln wieder schnell ab (Shalitin et al., 2003).

Biologische Funktion von *cry1* und *cry2* *Cry1* und *cry2* spielen zusammen mit den Phytochromen eine wichtige Rolle bei der Photomorphogenese von *Arabidopsis thaliana*. Die Cryptochrom-Mutanten sind in der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums, sowie der Öffnung des Hypokotylhakens beeinträchtigt (Ahmad und Cashmore, 1993; Neff und Chory, 1998). *Cry1* und *cry2* haben teilweise eine redundante Wirkung auf die Photomorphogenese, wobei die *cry2*-Mutante besonders unter Schwachlichtbedingungen ein verlängertes Hypokotyl ausbildet (Lin et al., 1998). Untersuchungen von Folta und Spalding (2001) belegen jedoch, dass die *cry2*-Mutante in der frühen Phase der Bestrahlung mit hoher Blaulichtintensität zwischen 30 und 120 min genauso stark wie die *cry1*-Mutante in der Wachstumsinhibition gestört ist, obwohl der Phänotyp bei der *cry1*-Mutante nach mehrtägiger Bestrahlung deutlich stärker ist als bei der *cry2*-Mutante. Dieses Phänomen lässt sich wahrscheinlich durch den blaulichtabhängigen Abbau des *cry2*-Proteins erklären.

Die Regulation der Entwicklung scheint zu einem großen Teil über lichtabhängige Veränderungen der Genexpression zu erfolgen. *Cry1* und *cry2* regulieren zusammen die blaulichtabhängigen Expressionsveränderungen von bis zu 10-20% des gesamten *Arabidopsis* Genoms (Ma et al., 2001). So führt z. B. die positive Regulation der Chalconsynthase durch *cry1* zu einer erhöhten Anthocyan-Akkumulation der Pflanzen im Blaulicht (Ahmad et al., 1995; Jackson und Jenkins, 1995). Cryptochrome regulieren außerdem zusammen mit den Phytochromen den Blühzeitpunkt von *Arabidopsis*. Besonders Cryptochrom 2 spielt eine große Rolle bei

dieser photoperiodischen Regulation. *Arabidopsis thaliana* ist eine fakultative Langtagpflanze und blüht unter Langtagbedingungen deutlich früher als im Kurztag. Die *cry2*-Mutante blüht dagegen im Langtag, jedoch nicht im Kurztag, später als der Wildtyp. Die *cry2*-Mutation betrifft dasselbe Gen wie bei der zuvor isolierten *fha*-Mutante, die in Bezug auf die Photoperiode ebenfalls insensitiv ist (Koornneef et al., 1991; Guo et al., 1998). Obwohl auch *cry1* Einfluss auf den Blühzeitpunkt hat (Bagnall et al., 1996), gelten *cry2* und *phyA* als die Hauptkomponenten bei der Detektion der Tageslänge in *Arabidopsis* (Mockler et al., 2003). Nur bei der *cry1/cry2*-Doppelmutante kann auch bei monochromatischer Blaulichtbestrahlung ein verspätetes Blühverhalten beobachtet werden, während keine der Einzelmутanten unter diesen Bedingungen einen Phänotyp aufweist (Mockler et al., 1999). Diese Untersuchungen deuten auf eine redundante Blühinduktion durch *cry1* und *cry2* hin. Auch bei der Synchronisation der Inneren Uhr spielen die Cryptochrome eine große Rolle. Die Periodenlänge ist bei der *cry1*-Mutante im Blaulicht von niedriger sowie hoher Intensität länger als bei WT-Pflanzen. Bei *cry2*-Mutanten wurde dagegen von Somers et al. (1998) nur bei Blaulichtbestrahlung mit niedriger Intensität ein relativ schwacher Effekt auf die Periodenlänge der Pflanzen festgestellt. Eine redundante Wirkung von *cry1* und *cry2* auf die Synchronisation der Inneren Uhr sowohl bei niedrigen, wie auch bei hohen Blaulichtintensitäten wurde jedoch durch die Analyse von *cry1/cry2*-Doppelmutanten eindeutig belegt. Die Periodenlänge ist in der Doppelmutante wesentlich länger als in den beiden Einzelmутanten (Devlin und Kay, 2000). *Cry1* scheint zudem im Blau- und Rotlicht an der Weiterleitung des *phyA*-Signals an die zentralen Komponenten der Inneren Uhr beteiligt zu sein. Im Gegensatz zu tierischen Cryptochromen dienen die pflanzlichen Cryptochrome allerdings nicht als Bestandteil des zentralen Oszillators der Inneren Uhr (Devlin und Kay, 2000).

Neuere Untersuchungen weisen auf weitere Funktionen der Cryptochrome hin, welche eigentlich bisher zu den klassischen Phototropin-Antworten gezählt hatten. So wurde von Whippo und Hangarter (2003) nachgewiesen, dass die Cryptochrome einen sekundären Einfluss auf den Phototropismus bei *Arabidopsis* haben und somit den Einfluss von Phototropinen auf die Bewegung des Hypokotyls regulieren. Bei geringen Fluenzraten führen die Cryptochrome zu einem verstärkten Phototropismus. Auch die blaulichtregulierte Öffnung der Stomata bei *Arabidopsis* wurde bisher lediglich dem Einfluss der Phototropine zugeschrieben. Aber auch die Stomata der *cry1/cry2*-Doppelmutante, welche eine erhöhte Trockentoleranz aufweist, zeigen eine verringerte Blaulichtantwort, während eine *cry1*-überexprimierende Pflanze bezüglich der Stomata-Öffnung hypersensitiv reagiert (Mao et al., 2005). Außerdem ist die *phot1/phot2*-Doppelmutante immer noch in der Lage, auf Blaulicht zu reagieren, während die Stomata der *cry1/cry2/phot1/phot2*-Vierfachmutante auf Blaulichtbestrahlung keinerlei Reaktion mehr zeigen (Mao et al., 2005).

Auch die lichtabhängige Entwicklung der Wurzeln wird bei *Arabidopsis thaliana* durch Cryptochrome reguliert. So konnte *cry1* als der wichtigste Photorezeptor für die Ergrünung von Wurzeln im Blaulicht identifiziert werden (Usami et al., 2004) und auch bei der Regulation

des Längenwachstums der Primärwurzel im Blaulicht spielen die Cryptochrome eine wichtige Rolle (Canamero et al., 2006). Die Wurzeln der *cry1*-Mutante sind dabei kürzer als bei WT-Pflanzen, während *cry1*-überexprimierende Pflanzen deutlich längere Wurzeln aufweisen. Die *cry2*-Mutante hat im Gegensatz dazu ein verstärktes Wurzelwachstum, wobei sich das Wurzelwachstum durch *cry2*-Überexpression im Vergleich zum WT verringert. *Cry1* und *cry2* scheinen also das Wachstum der Primärwurzel in antagonistischer Weise zu beeinflussen.

Für die Magnetfeldorientierung bei Vögeln dienen sehr wahrscheinlich die Cryptochrome im Auge der Tiere als Magnetrezeptoren über einen Radikal-Paar-Mechanismus (Mouritsen und Ritz, 2005). Untersuchungen von Ahmad et al. (2007) belegen auch bei *Arabidopsis thaliana* einen Einfluss des Magnetfeldes auf verschiedene Cryptochrom-Antworten, wie dem Hypokotylwachstum, der Anthocyan-Akkumulation und der *cry2*-Stabilität. Dabei scheint ein stärkeres Magnetfeld den Effekt von Cryptochrom auf das Hypokotylwachstum und die Anthocyan-Akkumulation zu verstärken und auch die *cry2*-Stabilität ist demnach in einem starken Magnetfeld herabgesetzt. Diese Ergebnisse konnten jedoch in einer unabhängigen Untersuchung von Harris et al. (2009) nicht reproduziert werden. Ein universeller Einfluss des Magnetfeldes auf pflanzliche Entwicklungsprozesse und damit auch eine biologische Relevanz einer Magnetrezeption bei Pflanzen bleibt also weiterhin ungeklärt.

Signaltransduktion von *cry1* und *cry2*

Die primäre Photoreaktion der Cryptochrome Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit mit den Photolyasen wurde zunächst für die Cryptochrome ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wie für die Photolyasen postuliert (Malhotra et al., 1995; Cashmore et al., 1999). Dabei wurde unter anderem, analog zu den DNA-Reparaturenzymen (Abschnitt 1.3.1), ein lichtinduzierter Elektronentransfer vom vollständig reduzierten FADH^- auf einen Reaktionspartner als möglicher Mechanismus beschrieben. Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass die primäre Photoreaktion der Cryptochrome ähnlich wie die zweite Photoreaktion der Photolyasen, die Photoaktivierung, verläuft. Anders als bei den Photolyasen, bei denen diese Reaktion für die katalytische Funktion *in vivo* nicht essentiell ist (Kavakli und Sancar, 2004), konnte die Relevanz der Reduktion des Flavin-Cofaktors durch einen Elektronentransfer über 3 konservierte aromatische Aminosäuren für die *in vivo* Funktion der Cryptochrome nachgewiesen werden (Giovani et al., 2003; Zeugner et al., 2005). Außerdem deuten die Aktionspektren von cryptochromregulierten Prozessen darauf hin, dass der Flavin-Cofaktor im Gegensatz zu den Photolyasen in seinem Grundzustand bei Dunkelheit als vollständig oxidiertes FAD vorliegt (Ahmad et al., 2002). Weitere überzeugende Argumente für eine biologisch relevante Photoreduktion und einen daraus resultierenden Photozyklus konnten schließlich durch spektroskopische und physiologische Experimente erbracht werden (Bouly et al., 2007; Banerjee et al., 2007). Als zusätzlichen Unterschied zum Mechanismus der Photolyasen wurde bei den Cryptochromen das neutrale Semichinon- FADH^\bullet -Radikal, welches bei Cryptochro-

men relativ stabil ist, als aktiver Signalzustand des Proteins identifiziert. Im Gegensatz zum vollständig reduzierten und zum oxidierten Flavin absorbiert das semireduzierte FADH^\bullet auch grünes Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 500 nm. Durch Bestrahlung mit Grünlicht kann somit das Gleichgewicht der Flavin-Redox-Zustände beeinflusst werden, wodurch auch verschiedene physiologische Cryptochrom-Antworten abgeschwächt werden. Im Dunkeln akkumuliert die inaktive oxidierte FAD-Form. Blaulichtbestrahlung fördert die Photoreduktion des Cofaktors, so dass sich ein Gleichgewicht der Redox-Zustände einstellt, wobei das aktive semireduzierte FADH^\bullet den größten Anteil darstellt. Durch zusätzliche Grünlichtbestrahlung kann das Verhältnis allerdings zugunsten der inaktiven reduzierten FADH^- -Form verschoben werden (Abbildung 6). Die Grünlichtbestrahlung hat somit einen negativen Einfluss auf *cry1*-Antworten wie Hypokotylwachstum und Anthocyangehalt (Bouly et al., 2007) und auch auf *cry2*-Antworten wie das Blühverhalten und den Abbau von *cry2* (Banerjee et al., 2007).

Die weiteren Schritte der Signaltransduktion bei den Cryptochromen sind teilweise noch ungeklärt. Es ist allerdings bekannt, dass die Cryptochrome blaulichtabhängig phosphoryliert werden und diese Phosphorylierung eng mit der Funktion und Regulation des Photorezeptors korreliert ist (Shalitin et al., 2002, 2003). Für *Arabidopsis cry1* konnte sogar eine blaulichtregulierte und ATP-abhängige Autophosphorylierung demonstriert werden (Shalitin et al., 2003; Bouly et al., 2003). Die Phosphorylierung des C-Terminus könnte somit nach einem Modell von Lin und Todo (2005) zu einer Konformationsän-

derung des Proteins führen, welche die Interaktion mit weiteren Proteinen der Signalkette bzw. deren Aktivierung ermöglicht. In der Tat konnten Konformationsänderungen der Cryptochrome nach Lichtaktivierung durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden (Partch et al., 2005; Kottke et al., 2006). Da die Dimerisierung von *cry1* und *cry2* als notwendige Voraussetzung für die Funktion der Cryptochrome beschrieben wurde (Sang et al., 2005; Rosenfeldt et al., 2008), ist auch ein Phosphotransfer vom N-Terminus eines Cryptochrom-Moleküls auf den C-Terminus des zweiten Cryptochroms im Dimer denkbar. Die Frage, wie eine Phosphorylierungsreaktion bzw. eine Konformationsänderung des Protein durch den Signalzustand des semireduzierten FADH^\bullet ausgelöst wird, kann bisher noch nicht beantwortet werden. Eine weitere Form der Regulation der Signaltransduktion wurde vor kurzem von Burney et al. (2009) beschrieben. Demnach induziert allein die ATP-Bindung von *cry1* unabhängig von Licht und der Autokinaseaktivität eine Konformationsänderung des Proteins. Durch diese Konformationsänderung scheint die Stabilität des lichtinduzierten Flavin-Radikals erhöht zu werden. Die ATP-Bindung selbst könnte somit eine biologische Funktion erfüllen und

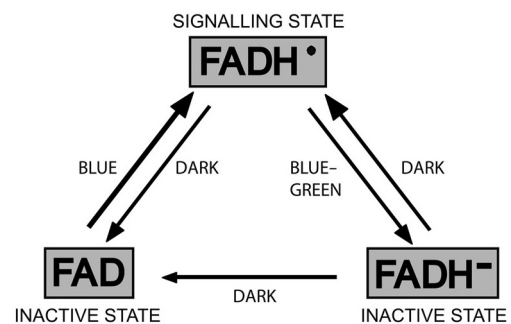


Abbildung 6: Modell des Cryptochrom Photozyklus. Abbildung aus Bouly et al. (2007).

die Aktivität der Cryptochrome regulieren. Sogar eine Cryptochrom-Regulation in Dunkelheit ist durch diesen Mechanismus nicht auszuschließen.

Signalweiterleitung Bei der Signalweiterleitung der Cryptochrome spielt die Interaktion mit anderen Proteinen eine entscheidende Rolle. Die Expression eines Fusionsproteins aus GUS mit dem C-Terminus von cry1 oder cry2 führt zu einem konstitutiven photomorphogenetischen Phänotyp (Yang et al., 2000), ähnlich dem zuvor von Deng et al. (1992) beschriebenen COP-Phänotyp von Mutanten in COP1 oder Komponenten des COP9-Signalosoms. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signaltransduktion von cry1 und cry2 durch den C-Terminus vermittelt wird und die Aktivität des C-Terminus wahrscheinlich durch die N-terminale PHR-Domäne der Cryptochrome lichtabhängig reguliert wird. So konnte gezeigt werden, dass cry1 und cry2 tatsächlich über ihre C-terminalen Domänen unabhängig von Licht mit COP1, einem negativen Regulator der Photomorphogenese, interagieren (Yang et al., 2001; Wang et al., 2001). COP1 fördert als E3-Ubiquitin-Ligase den proteasomalen Abbau von HY5, einem bZIP-Transkriptionsfaktor (*basic leucine zipper*), der direkt an die Promotoren von lichtregulierten Genen bindet und ihre Expression fördert (Osterlund et al., 2000; Wang et al., 2001). Nach dem Modell von Partch et al. (2005) ändert sich durch Blaulichteinfluss die Konformation des Cryptochrom C-Terminus, so dass die Interaktion von COP1 mit HY5 dadurch verhindert und der HY5-Proteinabbau somit unterdrückt wird. Außerdem könnte COP1 im Licht zusammen mit cry1 aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert werden. Insgesamt führt dies im Licht zu einer Akkumulation von HY5 im Kern und dadurch zu einer Induktion vieler lichtregulierter Gene.

Neben der Interaktion der Cryptochrome mit COP1 wurden zudem verschiedene physikalische Wechselwirkungen mit anderen Photorezeptoren beschrieben. So konnte eine Interaktion von cry1 mit phyA durch *yeast-two-hybrid* Experimente nachgewiesen werden (Ahmad et al., 1998b). Außerdem interagieren cry1 und phyB mit dem Photorezeptor ZTL (ZEITLUPE) (Jarrillo et al., 2001). ZTL spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Inneren Uhr (siehe Abschnitt 1.5). Für cry2 wurde mittels Coimmunopräzipitation und *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) Experimenten eine Interaktion mit phyB demonstriert. Die beiden Proteine treten im Kern zusammen in *speckles* auf, welche lichtabhängig gebildet werden (Más et al., 2000). Diese direkten Protein-Protein-Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Photorezeptoren bieten somit eine molekulare Erklärung für das Zusammenwirken der Photorezeptoren bei verschiedenen physiologischen Reaktionen der Pflanzen.

Neben dieser direkten Verschaltung von unterschiedlichen Photorezeptorsystemen und der COP1-Interaktion wurden in *Arabidopsis* noch einige andere Signalkomponenten der Cryptochrome identifiziert, die an der Transduktion des Blaulichtsignals beteiligt sind. So wurde mit AtPP7, einer Ser/Thr-Protein-Phosphatase, eine Komponente entdeckt, die einen positiven Regulator bei der Cryptochrom-Signalweiterleitung darstellt. PP7 ist dem Cryptochrom in der Signalkette nachgeschaltet. Ein Substrat von PP7 konnte jedoch bisher nicht gefun-

den werden (Møller et al., 2003). Das Ca^{2+} -bindende Protein SUB1 ist zwar keine direkte Komponente der Cryptochrom-Signalkette, spielt aber sowohl bei den Cryptochromen, als auch bei phyA eine Rolle als Regulator der Signaltransduktion. Die *sub1*-Mutanten weisen einen hypersensitiven Phänotyp bei Blau- und Dunkelrotbestrahlung auf (Guo et al., 2001). Der bHLH-Transkriptionsfaktor HFR1 (*long hypocotyl in far red*) stellt eine weitere Komponente dar, die Lichtsignale von cry1 und phyA verarbeitet. Die Deetiolierungsantwort der *hfr1*-Mutante ist besonders im starken Blaulicht reduziert. HFR1 ist im Gegensatz zu SUB1 ein positiver Regulator des Cryptochrom 1 Signalweges (Duek und Fankhauser, 2003). Die Regulation von HFR1 erfolgt durch einen proteasomalen Abbau des Proteins, der über COP1 vermittelt wird (Yang et al., 2005; Duek et al., 2004). HFR1 ist zudem als wichtiger Faktor an der cry1-abhängigen Regulation der Genexpression von vielen Genen beteiligt (Zhang et al., 2008).

Mit CIB1 (*cryptochrome interacting basic-helix-loop-helix*) wurde vor kurzem der erste Cryptochrom-Interaktionspartner beschrieben, der blaulichtspezifisch mit cry2 interagiert (Liu et al., 2008). Somit wäre eine ähnlich direkte Signalkaskade wie bei den Phytochromen und den PIF-Proteinen auch für die Cryptochrome denkbar. Die Interaktion der beiden Proteine im Blaulicht wurde durch *yeast-two-hybrid* Experimente und Coimmunopräzipitation nachgewiesen. Während für CIB1 *in vitro* eine starke Affinität für das G-Box-Motiv nachgewiesen wurde, scheint das Protein *in vivo* dagegen auch mit anderen E-Box-Motiven zu interagieren. Durch Analyse von *cib1*-Mutanten und -Überexpressionslinien wurde eine Rolle bei der Blühinduktion gezeigt. CIB1 fördert die Blühinduktion bei *Arabidopsis* durch eine direkte Stimulation der mRNA-Expression des FT-Proteins, welches in der Pflanze schließlich als sogenanntes "Blühhormon" wirkt. Damit wurde ein zweiter Signalweg der Cryptochrome beschrieben, der zu einer Aktivierung der FT-mRNA-Expression führt, da auch durch die lichtabhängige Deaktivierung von COP1 durch die Cryptochrome der Abbau des Transkriptionsfaktors CO (CONSTANS) unterdrückt wird, so dass CO sich anreichert und dadurch die Expression von FT aktiviert wird (Valverde et al., 2004).

Die meisten Untersuchungen deuteten bisher darauf hin, dass der Zellkern der Wirkungs-ort der Cryptochrome ist. *Arabidopsis* cry1 ist im Gegensatz zu cry2 jedoch auch im Cytoplasma nachweisbar und könnte dort ebenfalls von funktioneller Bedeutung sein. Durch ein artifizielles *targeting* von cry1 in den Zellkern bzw. ins Cytoplasma wurden von Wu und Spalding (2007) die Wirkungsorte von cry1 für die unterschiedlichen Cryptochrom-Antworten untersucht. Während die Anthocyan-Akkumulation und das Hypokotyl- und Petiolenwachstum ausschließlich durch nukleäres cry1 reguliert werden, ist die Regulation der Kotyledonen-Expansion alleine von cytoplasmatischem cry1 abhängig. Auf das Wurzelwachstum wirkt dagegen sowohl das nukleäre, als auch das cytoplasmatische cry1. Der positive Effekt auf das Wurzelwachstum scheint durch das cytoplasmatische Cryptochrom vermittelt zu werden, nukleäres cry1 bewirkt dagegen bei hohen Fluenzraten eine Inhibierung des Wurzelwachstums.

1.3.3 Cry DASH / cry3 aus *Arabidopsis thaliana*

Die DASH-Cryptochrome bilden eine weitere Unterfamilie der Cryptochrom/Photolyase-Familie. Da die ersten identifizierten Mitglieder dieser Gruppe aus *Arabidopsis* und *Synechocystis* eine relativ enge Verwandtschaft mit den Cryptochromen aus *Drosophila* und *Homo sapiens* aufweisen, werden sie als DASH-Cryptochrome (**D**rosophila, **A**rabidopsis, **S**ynechocystis, **H**omo) bezeichnet (Brudler et al., 2003). Mit dem offenen Leseraster sl1629 wurde in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 zunächst das erste prokaryotische Cryptochrom identifiziert (Hitomi et al., 2000). Die Kristallstruktur dieses Proteins ist der Struktur der Klasse I CPD-Photolyase sehr ähnlich, cryDASH zeigte jedoch keine eindeutige Photolyaseaktivität mit doppelsträngigen DNA-Proben mit CPD-Läsion. DNA *microarray* Analysen und die sequenzunspezifische DNA-Bindung von *Synechocystis* cryDASH deuten auf eine Funktion als Repressor für die Transkription einiger Gene hin (Brudler et al., 2003).

CryDASH aus *Arabidopsis thaliana* weist eine hohe Ähnlichkeit von etwa 50% über einen Bereich von 400 Aminosäuren mit dem *Synechocystis* cryDASH auf. Obwohl die Funktion dieses Proteins als Photorezeptor bisher noch nicht belegt werden konnte, wird es als Cryptochrom 3 (Atcry3) bezeichnet (Kleine et al., 2003). Für cry3 wurde zunächst keine Photolyaseaktivität nachgewiesen, es ist aber ebenso wie sl1629 in der Lage, DNA unspezifisch zu binden. Die Domänenstruktur von cry3 ist in Abbildung 3 B schematisch dargestellt. Cryptochrom 3 besteht aus 569 Aminosäuren und besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz für den Import des Proteins in Chloroplasten und Mitochondrien. Eine C-terminale Extension wie bei cry1 und cry2 ist zwar nicht vorhanden, cry3 besitzt jedoch neben der Signalsequenz eine N-terminale Extension, die ebenfalls das cryptochromspezifische DAS-Motiv enthält (Klar et al., 2007). Die Lokalisation von cry3 in den Chloroplasten und Mitochondrien wurde durch *in vitro* Importstudien an Erbsenchloroplasten und durch GFP-Fusionsexperimente gezeigt (Kleine et al., 2003). Ob cry3 jedoch in den Organellen, ähnlich wie das *Synechocystis* cryDASH, als Repressor der Genexpression dient, ist bislang noch völlig ungeklärt.

Neben der Kristallstruktur des *Synechocystis* cryDASH konnte mittlerweile auch die At-cry3-Struktur aufgeklärt werden (Huang et al., 2006; Klar et al., 2007). Cry3 weist wie erwartet eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum *Synechocystis* cryDASH und somit auch zu den anderen bekannten Vertretern aus der Cryptochrom/Photolyase-Familie auf. Die cry3 PHR-Domäne ist ebenso wie die Photolyase und At-cry1 in eine N-terminale α/β -Antennen-Domäne und die C-terminale α -helikale FAD-bindende Domäne unterteilt (Abbildung 4 B). Neben dem FAD-Cofaktor wurde MTHF als Antennenpigment mit einer effizienten Energieübertragung auf das FAD nachgewiesen. Ebenso ist MTHF in der Röntgenstruktur von cry3 vorhanden. Die funktionelle Bedeutung des MTHF als Antennenpigment bei der Photoreduktion des FAD wurde durch die Analyse von generierten Mutanten, die keinen zweiten Cofaktor tragen, bestätigt (Song et al., 2006; Klar et al., 2007). Die Elektronentransportkette von der Proteinoberfläche zum FAD, bestehend aus 3 konservierten Tryptophanresten, ist auch im cry3-Protein

vorzufinden. Bezüglich der Oberflächenstruktur und der elektrostatischen Ladungsverteilung im Bereich der FAD-Bindetasche unterscheiden sich die DASH-Cryptochrome von cry1 und ähneln eher den Photolyasen (Abbildung 4 A). Die DASH-Cryptochrome weisen in diesem Bereich hauptsächlich eine positive Ladung auf, wodurch, wie bei den Photolyasen, eine direkte DNA-Bindung ermöglicht wird. Außerdem kommt cry3 in Lösung im Gegensatz zu den "klassischen" *Arabidopsis* Cryptochromen höchstwahrscheinlich nicht als Dimer sondern als Monomer vor (Klar et al., 2007).

Auch der Photozyklus von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde durch spektroskopische Analysen eingehend untersucht (Song et al., 2006). Im Gegensatz zu aufgereinigtem *Arabidopsis* cry1 und cry2, bei denen der FAD-Cofaktor *in vitro* in der vollständig oxidierten Form vorliegt, trägt das isolierte cry3-Protein den Flavin-Cofaktor in einem Verhältnis von 5% semireduziertem FADH[•], 40% oxidiertem FAD und 55% vollständig reduziertem FADH⁻. Auch der FAD-Photozyklus scheint eher dem Photozyklus der Photolyasen zu entsprechen, da durch Lichtbestrahlung keine stabile FADH[•]-Radikalform gebildet wird, sondern hauptsächlich die vollständig reduzierte Form entsteht. Diese Reaktionen sind durch Dunkelreversion umkehrbar. Bei längerer Bestrahlung geht das Protein mit reduziertem FADH⁻ jedoch in eine andere Konformation über, welche im Dunkeln nicht mehr oxidiert werden kann. Auch der MTHF-Cofaktor in cry3 unterliegt einem Photozyklus. Das MTHF wird nach Bestrahlung zunächst in eine dunkelreversible MTHF⁻-Form überführt (Song et al., 2006). Durch länger dauernde intensive UV-A-Bestrahlung wird dieser Cofaktor, welcher zunächst als 5,10-Methenyl-THF vorliegt, irreversibel und spezifisch zu 5,10-Methylen-THF reduziert (Moldt et al., 2009). Eine mögliche physiologische Bedeutung dieser MTHF-Reduktion wird in Abschnitt 4.8 eingehender diskutiert.

Mitglieder der cryDASH-Gruppe konnten außer in *Synechocystis* und *Arabidopsis* noch in vielen anderen Organismen gefunden werden. Unter anderem wurden DASH-Cryptochrome auch in anderen Pflanzen wie Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Reis (*Oryza sativa*) (Facella et al., 2006), in Bakterien wie z.B. *Vibrio cholerae*, in Vertebraten wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (Daiyasu et al., 2004), dem filamentösen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* (Veluchamy und Rollins, 2008) und dem Dinoflagellaten *Karenia brevis* (Brunelle et al., 2007) identifiziert und beschrieben. Das homologe cryDASH aus Tomate weist eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu At-cry3 auf und besitzt ebenfalls ein Signalpeptid, welches verschiedenen Vorhersageprogrammen zufolge den Transport des Proteins in die Organellen vermittelt. Die mRNA-Expression des Tomaten cryDASH unterliegt außerdem einer circadianen Rhythmik mit jeweils einem Expressionsmaximum am Morgen und am Abend bei Anzucht der Pflanzen unter Langtagbedingungen (Facella et al., 2006). Die Autoren diskutieren zudem eine mögliche Rolle für cryDASH bei der Lichtsynchronisation der inneren Uhr. Auch Brunelle et al. (2007) halten eine Funktion des cryDASH aus dem Dinoflagellaten *Karenia brevis* bei der circadianen Kontrolle des Zellzyklus für möglich, da der Zellzyklus in diesem Organismus durch Blaulicht gesteuert wird und cryDASH bis-

her als einziger möglicher Blaulichtrezeptor identifiziert wurde. Auch in diesem Dinoflagellaten ist cryDASH in den Chloroplasten lokalisiert, wie durch Immunolokalisationsexperimente nachgewiesen werden konnte (Brunelle et al., 2007). Das cryDASH-Protein des pflanzenpathogenen Pilzes *Sclerotinia sclerotiorum* wurde von Veluchamy und Rollins (2008) durch die phänotypische Analyse von Mutanten auf eine mögliche Funktion bei der UV-A-abhängigen Entwicklung des Fruchtkörpers (*Apothecium*) untersucht. Die vegetativen Hyphen des Pilzes können sich zunächst zu einem *Sklerotium* differenzieren, einer Überdauerungsform bestehend aus einer kompakten Aggregation von vegetativen Hyphen umgeben von einer melaninpigmentierten Rindenschicht. Aus diesen *Sklerotien* können unter entsprechenden Bedingungen bei UV-A-Bestrahlung die *Apothecien*-Stiele keimen und sich zu den Fruchtkörpern zur Bildung von Ascosporen entwickeln. Die cryDASH-Transkripte akkumulieren 2-6 h nach UV-A-Bestrahlung besonders stark in den Apothecien. Für cryDASH konnte in *Sclerotinia sclerotiorum* jedoch kein Einfluss auf die funktionelle Entwicklung der Apothecien nachgewiesen werden. Die Fruchtkörper entwickeln sich in der Mutante bei Weißlichtbestrahlung ebenso wie bei den WT-Pilzen, lediglich eine vermehrte Bildung von pigmentierten hyphalen Auswüchsen am Fruchtstiel konnte bei Mutanten unter UV-A-Bestrahlung festgestellt werden. Obwohl cryDASH in den vegetativen *Sklerotien* kaum exprimiert wird, bildet die *cryDASH*-Mutante unter UV-A-Einfluss *Sklerotien* von geringerer Masse als beim WT aus. Bezüglich der Photoreaktivierung von UV-C-behandelten Ascosporen durch UV-A-Licht gibt es dagegen keinen Unterschied zwischen WT und Mutante. CryDASH scheint somit zumindest keinen großen Einfluss auf die Entwicklung und den Vermehrungszyklus dieses Pilzes zu haben.

Durch Komplementationsversuche wurde bereits von Daiyasu et al. (2004) eine geringe Photolyaseaktivität bei den DASH-Cryptochromen der Vertebraten festgestellt. Selby und Sancar (2006) konnten jedoch schließlich zeigen, dass cryDASH-Proteine zwar keine CPDs in doppelsträngiger DNA reparieren, diese UV-Schäden in einzelsträngiger DNA (ssDNA) dagegen mit hoher Effizienz, vergleichbar mit konventionellen Photolyasen, durch die DASH-Cryptochrome entfernt werden. Die Effizienz der Reparatur von CPD-Schäden in einzelsträngiger RNA ist dabei ebenso wie bei den Photolyasen wesentlich schlechter als die Reversion von Schäden in DNA-Strängen. Bei *in vivo* Untersuchungen zur Komplementation der Photoreaktivierung von Photolyase-defizienten *E. coli* Stämmen durch rekombinantes cryDASH aus *Vibrio cholerae* erfolgte jedoch keine nennenswerte Reparatur von UV-Schäden in der DNA. Selby und Sancar (2006) nehmen daher für die DASH-Cryptochrome eine biologische Funktion bei der Reparatur von ssDNA im Verlauf eines horizontalen Gentransfers an. Die Art und Weise der Bindung und Reparatur von ssDNA durch *Arabidopsis* cry3 wurde vor kurzem von Pokorny et al. (2008) durch die Lösung der Kristallstruktur des Proteins mit gebundener einzelsträngiger DNA nach Reparatur eines CPD-Schadens demonstriert. Die Strukturdaten zeigen, dass bei cry3 die Bindung an das Thymin-Dimer ähnlich wie bei Photolyasen erfolgt, allerdings kommt bei der Interaktion von cry3 mit doppelsträngiger DNA keine stabilisierende Bindung zwischen dem Protein und dem Phosphat-Rückgrat des Gegenstranges zustande.

Außerdem scheint die Substrat-bindende Tasche in cry3 weniger hydrophob als bei Photolyasen zu sein, was zu einer geringeren Affinität zu CPD-Schäden führt. Dadurch kommt es bei dsDNA zu keinem *flip out* des CPD-Schadens und ein Thymin-Dimer in doppelsträngiger DNA kann von cry3 somit nicht repariert werden. Bei ssDNA ist das Herausdrehen des CPDs und dadurch die Bindung im katalytischen Zentrum dagegen energetisch begünstigt, da hier keine Wasserstoff-Brücken zum Gegenstrang aufgebrochen werden müssen. Somit ist auch eine Reparatur von dsDNA durch cry3 möglich, wenn der Bereich um den Schaden in einzelsträngiger Form vorliegt. Eine *loop* Struktur von nur vier Basen um den DNA Schaden ist für eine effiziente Reparatur von doppelsträngiger DNA ausreichend (Pokorny et al., 2008). Demnach wäre es denkbar, dass cry3 im Zusammenhang mit Vorgängen wie Replikation und Transkription, bei denen die DNA partiell einzelsträngig vorliegt, eine Funktion als DNA-Reparaturenzym ausübt.

1.3.4 Evolution der Cryptochrom / Photolyase-Familie

Die Cryptochrom / Photolyase-Familie lässt sich aufgrund phylogenetischer Analysen in 5 Unterfamilien einteilen: (1) die tierischen Cryptochrome und (6-4)-Photolyasen, (2) die Klasse I CPD-Photolyasen, (3) die pflanzlichen Cryptochrome, (4) die Klasse II CPD-Photolyasen und (5) die DASH-Cryptochrome (Brudler et al., 2003). Die phylogenetische Verwandtschaft dieser Unterfamilien ist in Abbildung 7 mit Ausnahme der Klasse II CPD-Photolyasen dargestellt. Demnach sind die tierischen Cryptochrome sehr nah mit den (6-4)-Photolyasen verwandt, während die pflanzlichen Cryptochrome mehr Ähnlichkeit zu den Klasse I CPD-Photolyasen aufweisen. Dies führte zu der Annahme, dass sich pflanzliche und tierische Cryptochrome nach der Aufspaltung der Prokaryoten und Eukaryoten unabhängig voneinander entwickelt haben (Cashmore et al., 1999). Die Identifikation eines prokaryotischen Cryptochroms (Hito-mi et al., 2000) scheint jedoch eher die Auffassung zu stärken, dass sich die Cryptochrome vor dieser Aufspaltung aus den Photolyasen entwickelt haben (Kanai et al., 1997; Brudler et al., 2003). Auch die Anwesenheit von DASH-Cryptochromen in Vertretern aus Pflanzen, Bakterien, Pilzen und Wirbeltieren deutet auf eine sehr frühe Evolution der Cryptochromfamilie hin (Daiyasu et al., 2004). Die Gruppe der DASH-Cryptochrome ist nach Brudler et al. (2003) relativ nah mit den (6-4)-Photolyasen und den tierischen Cryptochromen verwandt. Nach diesem Modell hat sich die Photolyase / Cryptochrom-Familie aus einer ursprünglichen Photolyase entwickelt.

Die CPD-Photolyasen sind wahrscheinlich schon in einem sehr frühen Stadium des Lebens auf der Erde entstanden. Da die UV-Einstrahlung zu dieser Zeit aufgrund der noch nicht vorhandenen Ozonschicht um ein Vielfaches höher war, ist anzunehmen, dass die Photolyasen als DNA-Reparaturenzyme zumindest für die frühen photosynthetischen Organismen überlebenswichtig waren. Im Laufe der evolutionären Entwicklung gingen die Photolyasen jedoch in vielen Entwicklungslinien verloren und wurden durch andere Reparatursysteme ersetzt. So

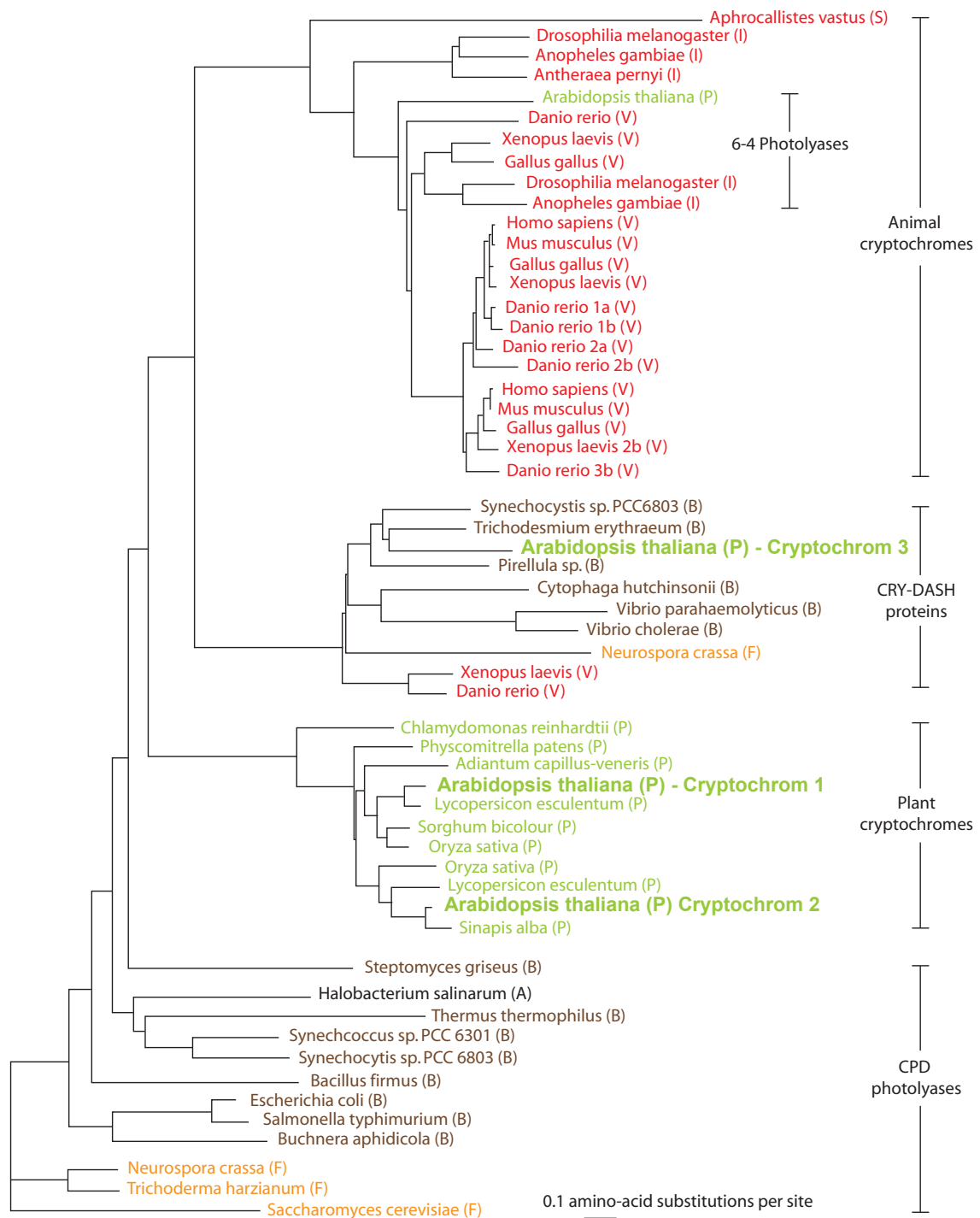


Abbildung 7: Stammbaum der Cryptochrom/Photolyase Familie. Verändert nach Lin und Todo (2005). Die Unterfamilien sind auf der rechten Seite gekennzeichnet. Die CPD-Photolyasen der Klasse II wurden nicht berücksichtigt. Abkürzungen: (V) Vertebraten, (B) Bakterien, (A) Archaea, (I) Insekten, (P) Pflanzen, (F) Pilze.

besitzen plazentale Säugetiere zwar keine Photolyasen, die Cryptochrome sind jedoch weiterhin vorhanden. Vor kurzem wurde von Lucas-Lledó und Lynch (2009) eine neue Prokaryoten-spezifische Gruppe von Photolyase-homologen Genen postuliert, die sie in die Gruppe der (6-4)-Photolyasen und tierischen Cryptochrome einordnen. Falls die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine eine (6-4)-Photolyase-Funktion aufzeigen würde, spräche dieser Befund dafür, dass auch die (6-4)-Photolyasen vor der Entwicklung der Eukaryoten entstanden sind (Lucas-Lledó und Lynch, 2009).

Nach einem anderen Modell könnten die Pflanzen ihre Cryptochrome unabhängig voneinander durch horizontalen Gentransfer erhalten haben. Die enge Verwandtschaft von *Arabidopsis* cry3 mit *Synechocystis* cryDASH, könnte darauf hindeuten, dass das CRY3-Gen von einem endosymbiontischen Vorläufer der Chloroplasten in den Zellkern transferiert wurde. Demnach könnten die Pflanzen die andere Gruppe der Cryptochrome (cry1 und cry2 bei *Arabidopsis*) durch einen unabhängigen Gentransfer von den α -Proteobakterien, den Vorläufern der Mitochondrien, erhalten haben (Kleine et al., 2003).

1.4 Phototropine

Obwohl das Phänomen des Phototropismus bereits von Darwin (1880) beschrieben wurde, wurden die Phototropine als hauptverantwortliche Photorezeptoren in *Arabidopsis thaliana* erst viel später identifiziert (Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001). Die beiden Phototropine phot1 und phot2 (ehemals NPH1 und NPL1) sind Flavoproteine, die Strahlung im Blau- / UV-A-Bereich absorbieren. Als Chromophore dienen zwei FMN-Moleküle (Flavinmononukleotid), die über jeweils eine LOV-Domäne im Dunkelzustand nicht-kovalent mit dem Protein verknüpft sind. LOV-Domänen (**L**ight, **O**xygen, **V**oltage) gehören zu einer Untergruppe der PAS-Domänen, die hauptsächlich durch Licht, Sauerstoff oder Spannung reguliert werden. Beide Phototropine enthalten am C-Terminus eine klassische Ser/Thr-Kinase-Domäne (schematische Darstellung in Abbildung 3 A) und für beide Proteine konnte eine Autophosphorylierung nach Blaulichtbestrahlung nachgewiesen werden (Christie et al., 1998, 2002; Sakai et al., 2001). Phot1 und phot2 sind zwar hydrophile Proteine, sie sind aber dennoch mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Nach Blaulichtaktivierung scheint allerdings eine Dissoziation der Proteine von der Membran zu erfolgen (Sakamoto und Briggs, 2002; Kong et al., 2006).

Obwohl phot1 und phot2 für ähnliche blaulichtgesteuerte Reaktionen verantwortlich sind, unterscheiden sie sich teilweise in ihren photochemischen Eigenschaften (Sakai et al., 2001). Beide Phototropine sind für den Phototropismus des Hypokotyls bei hohen Bestrahlungsintensitäten verantwortlich, unter Schwachlichtbedingungen wird der Phototropismus dagegen nur von phot1 vermittelt. Daneben sind die Phototropine auch für einige andere Bewegungsreaktionen verantwortlich. Beide Phototropine steuern die Chloroplastenbewegung und induzieren die Öffnung der Stomata in Abhängigkeit vom Lichtfluss (Kinoshita et al., 2001; Sakai et al., 2001). Diese Photorezeptoren sind somit für die Optimierung der Photosyntheseausbeute ei-

ner Pflanze sehr wichtig. Des Weiteren sind die Phototropine an der frühen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums nach Blaulichtbestrahlung beteiligt (Folta und Spalding, 2001) und steuern neben den Cryptochromen auch das Kotyledonen- und Blattflächenwachstum (Ohgishi et al., 2004).

Die Absorption von Blaulicht führt bei den Phototropinen zu einem Photozyklus. Der zuvor nicht-kovalent gebundene Chromophor wird über ein Cysteinyl-FMN-Addukt gebunden, so dass sich das Absorptionsmaximum der LOV-Domäne von 447 nm nach 390 nm verschiebt. Diese Reaktion ist in Dunkelheit innerhalb von Sekunden bis Minuten komplett reversibel (Swartz et al., 2001). Die Bildung des Cysteinyl-Addukts führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des Proteins. C-terminal der LOV2-Domäne befindet sich eine konservierte Helix-Struktur mit der Bezeichnung J α -helix, die nur im Dunkeln mit der Oberfläche der LOV2-Domäne assoziiert ist. Durch Lichteinwirkung wird diese Interaktion aufgehoben und die Kinase-Domäne der Phototropine somit aktiviert. Neben den Phototropinen selbst sind bisher allerdings keine weiteren Substrate für eine lichtabhängige Phosphorylierung in Pflanzen bekannt (Demarsy und Fankhauser, 2009). Für die weitere Signaltransduktion der einzelnen Phototropin-Antworten wurden einige Interaktionspartner der Phototropine als mögliche Mitglieder einer Signalkaskade identifiziert. Das ebenfalls membranassoziierte Protein NPH3 interagiert mit phot1 und ist unter anderem an der Regulation des Phototropismus beteiligt (Motchoulski und Liscum, 1999). Auch für das mit NPH3 verwandte Protein RPT2 wurde eine phot1-Interaktion und eine wichtige Bedeutung für die Steuerung des Phototropismus sowie der Stomataöffnung gezeigt (Sakai et al., 2000; Inada et al., 2004). Die Aktivierung von phot1 und phot2 führt zudem zu einem Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration, was wiederum als wichtiges Signal für die phot1-abhängige Inhibierung des Hypokotylwachstums, die lichtinduzierte Stomataöffnung und die Chloroplastenbewegung dient (Übersicht in Christie, 2007).

1.5 Die ZTL-Familie und die Innere Uhr

Mit ZTL (ZEITLUPE), FKF1 (*flavin-binding, kelch repeat, F-box*) und LKP2 (*LOV kelch protein 2*) wurde eine Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana* beschrieben, bei der es sich höchstwahrscheinlich um eine weitere Klasse von Blaulichtphotorezeptoren handelt, welche die Regulation der circadianen Rhythmik und des Blühzeitpunktes unter Langtagbedingungen beeinflussen (Imaizumi et al., 2003). Alle drei Proteine weisen eine ungewöhnlich hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz und Domänenstruktur auf (Abbildung 3 C). Am N-Terminus befindet sich eine LOV-Domäne, welche den Flavin-bindenden LOV-Domänen der Phototropine und des Photorezeptors White Collar-1 (WC-1) aus *Neurospora crassa* sehr ähnelt (Somers, 2001; Somers et al., 2004). Auch in ihren photochemischen Eigenschaften sind sie den LOV-Domänen der Phototropine sehr ähnlich, jedoch kann bei den Mitgliedern der ZTL-Familie keine Dunkelreversion beobachtet werden (Imaizumi et al., 2003). Außerdem findet man bei

allen Proteinen dieser Familie eine F-box-Domäne und ein Motiv von 6 *kelch repeats*. Diese beiden Domänen vermitteln wahrscheinlich zusammen die Markierung bestimmter Proteine für den proteasomalen Abbau. F-Box-Proteine sind zentrale Bestandteile der SCF-E3-Ligase-Komplexe.

Sowohl für FKF1, als auch für ZTL konnte bereits eine Funktion als Photorezeptor gezeigt werden. FKF1 reguliert den photoperiodischen Blühzeitpunkt von *Arabidopsis* durch die positive Regulation des *CONSTANS*-Gens. Bei der Blühinduktion von *Arabidopsis* im Langtag spielen *CONSTANS* (CO) und *FLOWERING LOCUS T* (FT) eine große Rolle. Die mRNA-Expression von CO unterliegt der Kontrolle der Inneren Uhr und akkumuliert unter Langtagbedingungen am späten Tag. Durch Licht wird CO am Abend stabilisiert, während es am Morgen proteasomal abgebaut wird. Wenn eine hohe Menge an CO mit dem Lichtsignal zusammentrifft (im Langtag), wird die Expression von FT induziert, wodurch es nachfolgend zur Blütenbildung kommt (Suárez-López et al., 2001; Valverde et al., 2004). FKF1 reguliert dabei die Stabilität des CDF1-Proteins (*Cycling Dof Factor 1*), einem direkten Repressor der CO-Expression. FKF1 interagiert nach Blaulichtanregung spezifisch mit GIGANTEA (GI), einem weiteren positiven Regulator der CO-Expression. Im Komplex mit FKF1 kann GI mit dem Repressor CDF1 interagieren, so dass CDF1 abgebaut wird und die CO-Expression induziert wird (Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007).

Auch ZTL interagiert lichtabhängig mit GI, wodurch das ZTL-Protein selbst stabilisiert wird. Die GI-Expression unterliegt einer circadianen Rhythmik, wodurch die diurnale Regulation des ZTL-Proteins trotz konstitutiver mRNA-Expression erklärt werden kann (Kim et al., 2007). ZTL reguliert zudem die Stabilität von TOC1, einem zentralen Bestandteil des Oszillators der Inneren Uhr, indem es TOC1 für den proteasomalen Abbau markiert. Durch die Interaktion von ZTL mit GI wird die Ubiquitinierung der ZTL-Zielproteine möglicherweise inhibiert. Durch diesen Mechanismus wird ein diurnaler Rhythmus von TOC1 mit hoher Amplitude ermöglicht (Más et al., 2003; Kim et al., 2007; Kiba et al., 2007).

Die Regulation von TOC1 ist entscheidend für die Funktion der Inneren Uhr bei *Arabidopsis*. Die Innere Uhr besteht aus einem zentralen Oszillator, der einen ungefähren Rhythmus von 24 h vorgibt. Dieser Oszillator wird täglich durch Licht justiert. Als zentrale Bestandteile konnten neben TOC1 die Proteine LHY und CCA1 identifiziert werden. Diese Proteine bilden eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife, indem TOC1 die Expression von LHY/CCA1 am frühen Abend stimuliert. Dadurch steigt die Proteinmenge von LHY/CCA1, welche am darauffolgenden Morgen die TOC1-Expression inhibieren, indem sie direkt an Elemente des TOC1-Promotors binden. Dies lässt wiederum die LHY/CCA1-Konzentration absinken, so dass TOC1 wieder exprimiert werden und die LHY/CCA1-Expression erneut stimulieren kann (Alabadí et al., 2001). Neben ZTL sind auch die Cryptochrome und Phytochrome an der täglichen Synchronisation der Inneren Uhr durch Licht beteiligt.

1.6 Entwicklung und Regulation der Chloroplasten

Die Plastiden sind ein charakteristisches Organell pflanzlicher Zellen, welches sie von den tierischen eukaryotischen Zellen unterscheidet. Ebenso wie die Mitochondrien sind die Plastiden endosymbiontischen Ursprungs. Diese endosymbiotische Beziehung entstand vermutlich vor 1,2 - 1,5 Milliarden Jahren mit der Aufnahme eines photosynthetischen Cyanobakteriums durch eine eukaryotische Zelle (Pechtl und Maier, 2001; Hjorth et al., 2004; Lopez-Juez und Pyke, 2005). Dadurch waren die Pflanzen schließlich in der Lage, das Licht der Sonne als primäre Energiequelle zu nutzen. Daneben sind die Chloroplasten allerdings auch an der Biosynthese vieler Sekundärmetabolite beteiligt und spielen bei der Entwicklung der Pflanzen eine entscheidende Rolle. Die pflanzlichen Organellen besitzen zwar noch ein eigenes Genom, der größte Teil ihrer genetischen Informationen wurde jedoch im Laufe der Zeit in den Zellkern transferiert. So besteht das Proteom der Chloroplasten aus 3500 bis 4000 Proteinen, wobei das Chloroplastengenom von *Arabidopsis* aber weniger als 80 Proteine kodiert. Zum Import der benötigten kernkodierten Proteine aus dem Cytoplasma haben die Chloroplasten und die Mitochondrien jeweils spezifische Translokationssysteme entwickelt (Übersicht in Rehling et al., 2004; Soll und Schleiff, 2004). Oftmals sind die importierten und die organelenkodierten Proteine Teil eines Proteinkomplexes, so dass der Importprozess gut koordiniert werden muss. Ebenso muss auch die Expression der Plastiden-kodierten Gene den Bedürfnissen der Zellen angepasst werden.

1.6.1 Import von Proteinen

Chloroplasten besitzen 3 unterschiedliche Membransysteme. Die Plastiden werden von einer äußeren und einer inneren Hüllmembran umgeben, während das Netzwerk der Thylakoidmembranen die photosynthetisch aktiven Proteinkomplexe enthält. Daher kann man bei den Chloroplasten drei wässrige Kompartimente unterscheiden: Der Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Hüllmembran, das Stroma und das Lumen innerhalb der Thylakoidmembranen. Die Proteine müssen also nicht nur vom Cytoplasma in die Chloroplasten transportiert werden, sondern auch innerhalb der Plastiden ihren richtigen Bestimmungsort finden (Übersicht in Soll und Schleiff, 2004).

Die meisten Proteine, die für den Import in die Chloroplasten bestimmt sind, werden als Präproteine mit einer N-terminalen Transitsequenz synthetisiert. Diese Transitsequenz wird nach dem Import proteolytisch entfernt. Einige Plastidenproteine besitzen keine solche abspaltbare Transitsequenz und enthalten die Informationen für ihre Lokalisation im reifen Protein. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Proteine der äußeren Membran. Für den Transport der Präproteine in das Stroma der Chloroplasten sind zwei Translokationskomplexe verantwortlich. Der TOC-Komplex (*translocase of the outer envelope membrane of chloroplasts*) ist in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert und transportiert die Proteine durch die äußere Membran in den Intermembranraum. Der TIC-Komplex (*translocase of the inner*

envelope membrane of chloroplasts) in der inneren Membran ist dann für den Transport der Proteine aus dem Intermembranraum in das Stroma verantwortlich. Meistens funktionieren diese beiden Komplexe als Einheit, indem die Präproteine aus dem TOC-Komplex über den TIC-Komplex direkt weiter ins Stroma geleitet werden. Der TOC-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, wobei die GTP-bindenden TOC159- und TOC34-Untereinheiten wahrscheinlich als Bindungsstellen für die Präproteine dienen. Der Kanal, durch den das Protein in den Membranzwischenraum transportiert wird, wird von TOC75 gebildet. Im TIC-Translokationskomplex wurden bisher 6 Untereinheiten identifiziert, wobei TIC110 den Kanal durch die innere Hüllmembran der Chloroplasten darstellt. Die Energie für die Translokation der Proteine durch diese Membran wird wahrscheinlich durch Chaperone bereitgestellt (Übersicht in Soll und Schleiff, 2004).

Proteine, die in die Thylakoidmembranen oder in das Thylakoidlumen transportiert werden müssen, enthalten oft eine doppelte Transitsequenz. Die N-terminale Hälfte dieser Transitsequenz ist für den Transport in das Stroma verantwortlich. Nachdem dieser Teil der Sequenz im Stroma abgespalten wurde, wird das Protein über die somit freigelegte neue Transitsequenz in das Thylakoidlumen transportiert (Robinson et al., 1993). Der Import in das Thylakoidlumen kann über verschiedene Transportsysteme erfolgen. Die Plastiden nutzen dazu unter anderem das SecA-Protein zur Translokation durch die Thylakoidmembran. Ein ähnliches System dient bei Bakterien zur Sekretion von Proteinen. Über das Δ pH-abhängige sogenannte Tat-Transportsystem (*twin-arginine translocation*) können Proteine dagegen sogar im gefalteten Zustand in das Thylakoidlumen importiert werden. Integrale Thylakoidmembran-Proteine nutzen entweder den SRP-abhängigen (*signal recognition particle*) Transportweg, können zum Teil aber auch ohne die Hilfe von bekannten Translokationssystemen in die Membran integriert werden (Robinson et al., 2001; Mori und Cline, 2001).

Der Proteinimport in die Mitochondrien erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip durch verschiedene Translokasen. Hierbei vermitteln die TOM- (*translocase of the outer membrane of mitochondria*) und TIM-Komplexe (*translocase of the inner membrane of mitochondria*) den Transport der Präproteine durch die einzelnen Membransysteme. Der Transport von Proteinen in die jeweiligen Organellen ist im Normalfall höchst spezifisch. Die Chloroplasten und die Mitochondrien haben unterschiedliche Translokationssysteme entwickelt, die jeweils bestimmte Signalsequenzen erkennen. Dennoch gibt es einige Fälle, in denen ein Protein sowohl in Mitochondrien, als auch in Chloroplasten transportiert wird (Peeters und Small, 2001). So können zum Beispiel Präproteine mit unterschiedlichen Signalsequenzen durch die Verschiebung des Translationsstarts entstehen oder eine Signalsequenz enthält Motive, die von beiden Translokationssystemen erkannt werden (Peeters und Small, 2001).

1.6.2 Genregulation in Plastiden

Das plastidäre Genom von *Arabidopsis thaliana* besteht aus einem zirkulären Chromosom mit einer Größe von 154 kb. Plastiden zeichnen sich zudem durch eine sehr hohe Polyplodie aus. Ein Chloroplast kann bis zu 100 Kopien seines Genoms enthalten. Ähnlich wie bei Bakterien ist die plastidäre DNA in Form von Nukleoiden mit der inneren Membran assoziiert. Aufgrund des endosymbiotischen Ursprungs der Plastiden ist es nicht verwunderlich, dass der genetische Apparat der Chloroplasten grundsätzlich dem eubakteriellen Typ entspricht. Viele Gene werden zusammen als polycistronische Einheit exprimiert, allerdings können im Gegensatz zu den bakteriellen Genen einige plastidäre Gene Introns enthalten (Lopez-Juez und Pyke, 2005; Maier et al., 2008). Chloroplasten enthalten 2 unterschiedliche Arten von RNA-Polymerasen, die kernkodierte NEP (*nuclear-encoded plastid RNA polymerase*) und die plastidenkodierte PEP (*plastid-encoded plastid RNA polymerase*). Die kernkodierte PEP besteht nur aus einer Untereinheit und weist Homologie zu RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen auf. Die PEP ähnelt dagegen der RNA-Polymerase aus *E. coli* und ist aus 4 verschiedenen plastidenkodierten Untereinheiten aufgebaut: 2 α -Untereinheiten (*rpoA*), 1 β -Untereinheit (*rpoB*), 1 β' -Untereinheit (*rpoC1*) und 1 β'' -Untereinheit (*rpoC2*). Außerdem benötigt die plastidäre PEP wie ihre bakteriellen Gegenstücke einen zusätzlichen Sigma-Faktor, der für die spezifische Promotorerkennung zuständig ist. *Arabidopsis thaliana* besitzt 6 Sigma-Faktoren (AtSIG 1-6), die alle im nukleären Genom codiert sind. Die meisten Promotoren der plastidären Gene sind wie bei den Prokaryoten durch ein -35 (TTGACA) und ein -10 (TATAAT) Element charakterisiert. Der ursprünglichen Lehrmeinung zufolge unterliegt die Aktivität der verschiedenen RNA-Polymerasen einer festgelegten zeitlichen Abfolge während der Pflanzenentwicklung. Zunächst ist nur die NEP in den Plastiden aktiv und transkribiert hauptsächlich *housekeeping* Gene, darunter auch die Untereinheiten der PEP. Schließlich übernimmt die synthetisierte PEP den Großteil der Transkription und ist vor allem für die Expression der plastidären Photosynthese-Gene zuständig (Mullet, 1993). Neuere Untersuchungen von Demarsy et al. (2006) zeigen jedoch, dass die PEP- und NEP-Transkriptionsapparate während der Keimung gleichzeitig aufgebaut werden und beide RNA-Polymerasen bereits in den trockenen Samen vorhanden sind.

Die Sigma-Faktoren spielen eine große Rolle bei der Regulation der plastidären Transkription und der Koordination mit anderen kernkodierten plastidären Genen. Besonders die Rolle von AtSIG5 wurde dabei bisher eingehend untersucht. Dieser Sigma-Faktor ist für die blaulichtspezifische Induktion der Transkription des *psbD*-Gens verantwortlich. Der Transkriptionsstart kann bei diesem Gen von verschiedenen Promotoren aus erfolgen und AtSIG5 bindet spezifisch an den *psbD*-BLRP (*blue light responsive promoter*) (Tsunoyama et al., 2004). Die Expression der AtSIG5-mRNA wird blaulichtspezifisch durch Cryptochrom 1 und 2 induziert und so kann das Lichtsignal vom Kern sehr schnell in die Plastiden weitergeleitet werden (Mochizuki et al., 2004). Die SIG5-Expression erfolgt dabei biphasisch, der Induktion durch

geringe Fluenzraten folgt eine weitere Induktion bei hohen Blaulicht-Fluenzraten (Onda et al., 2008). AtSIG5 ist zwar hauptsächlich an der psbD-Regulation beteiligt, aber auch die psbA- und rbcL-Transkription wird durch diesen Faktor in geringerem Umfang beeinflusst. Auch die Expression des Sigma-Faktors AtSIG1 wird durch Licht stark induziert. Anders als bei AtSIG5 erfolgt diese Induktion jedoch nicht nur durch Blaulicht, sondern auch durch Rotlichtbestrahlung. An dieser Regulation sind cry1 und cry2 zumindest teilweise beteiligt (Onda et al., 2008). AtSIG1, als genereller Sigma-Faktor, und AtSIG5 scheinen vor allem während der späteren Stadien der Chloroplastenentwicklung in reifen Blättern als Regulatoren der PEP-abhängigen Transkription in Plastiden zu wirken. Die Expression der übrigen Sigma-Faktoren wird zwar ebenfalls durch Licht beeinflusst, die Induktion ist allerdings wesentlich langsamer und schwächer als bei AtSIG1 und AtSIG5 (Onda et al., 2008). SIG2 und SIG6 haben eine besondere Bedeutung bei der frühen Transkription von Photosynthesegenen während der Keimlingsentwicklung. Insgesamt haben die Sigma-Faktoren 1, 3, 4 und 6 neben einigen spezifischen Funktionen eine redundante Wirkung bei der Regulation der Photosynthesegene in reifen Blättern (Übersicht in Shiina et al., 2009). Zusätzlich zu dieser Transkriptions-Regulation in Chloroplasten gibt es ebenfalls viele Hinweise auf eine Regulation der Genexpression auf der Translationsebene (Bruick und Mayfield, 1999). Plastiden-kodierte mRNAs haben in der Regel eine sehr lange Lebensdauer von einigen Stunden bis mehreren Tagen. Außerdem konnten einige RNA-bindende Proteine in Chloroplasten nachgewiesen werden, die spezifisch den 5' untranslatierten Bereich von plastidären mRNAs binden und dadurch möglicherweise an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Barnes et al., 2004; Lurin et al., 2004).

Neben der Genregulation während der plastidären Entwicklung findet man bei adulten *Arabidopsis* Pflanzen eine Reihe von Regulationsprozessen für den photosynthetischen Apparat, um die Photosynthesekapazitäten den jeweiligen Lichtbedingungen anpassen zu können. Diese Akklimatisations-Reaktionen schützen die Pflanzen vor der schädlichen Wirkung von hohen Lichtintensitäten und ermöglichen eine optimale Ausbeute bei schwachen Lichtbedingungen. Die photosynthetischen Antennenkomplexe werden bei Starklicht reduziert, während die Photosysteme und Enzyme des Calvin-Zyklus induziert werden. Dadurch verändert sich die gesamte Ultrastruktur der Chloroplasten, wobei der Anteil der Grana-Thylakoide bei hohen Lichtintensitäten abnimmt (Weston et al., 2000). Die Lhcb-Expression ist unter diesen Bedingungen reduziert und auch die Mesophyll-Zellen der Blätter reagieren auf die entsprechenden Lichtintensitäten. Die Palisadenzellen sind bei Starklichtbedingungen deutlich länger als im Schwachlicht und können mehrere Schichten bilden. Obwohl einige Akklimatisations-Reaktionen eine besondere Sensitivität gegenüber Blaulicht aufweisen, werden diese Reaktionen weder durch cry1 und cry2, noch durch die Phototropine beeinflusst (Weston et al., 2000; López-Juez et al., 2007). Der Photosynthese-Apparat selbst scheint jedoch eine entscheidende Rolle bei diesen Anpassungsprozessen zu spielen. So wird die *Lhcb*-Expression im Zellkern durch Redox-Prozesse innerhalb der Chloroplasten reguliert. Das photoreduzierte Plastochinon, welches unter Starklichtbedingungen akkumuliert, wurde als mögliches Signal

für diesen Prozess identifiziert (Escoubas et al., 1995; Pfannschmidt et al., 1999). Die weitere Signaltransduktion ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt.

Zusätzlich zu dieser Redox-Regulation existiert in *Arabidopsis* noch ein weiterer plastidärer Signalweg, der unter anderem die Expression von nukleären Photosynthesegenen während der Plastidenentwicklung steuert (Nott et al., 2006). Wird die Chloroplastenentwicklung durch Mutationen oder Inhibitoren blockiert, dann werden auch die kernkodierte Photosynthesegene durch ein plastidäres Signal sehr effizient inhibiert. Die molekulare Natur dieses Plastiden-Zellkern-Signalweges ist bislang nur sehr unzureichend verstanden, es wurden jedoch einige sogenannte *gun*-Mutanten (*genomes uncoupled*) identifiziert. Die kernkodierte Photosynthesegene dieser Mutanten werden nicht oder nur geringfügig reprimiert, wenn die Chloroplastenentwicklung blockiert wird. Neuere Untersuchungen deuten zudem darauf hin, dass die Signaltransduktion des Plastiden-Signals eng mit dem Signalweg der Photorezeptoren verknüpft ist. Bei der Suche nach weiteren *gun*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass auch Cryptochrom 1 an der Regulation von kernkodierten Genen durch ein plastidäres Signal beteiligt ist (Ruckle et al., 2007).

1.7 Zielsetzung

Arabidopsis Cryptochrom 3 (cry3) aus der Familie der DASH Cryptochrome wurde als plastiden- und mitochondrienlokalisiertes Protein identifiziert (Kleine et al., 2003). Die Kristallstruktur von cry3 konnte mittlerweile aufgeklärt werden und seine biochemischen Eigenschaften wurden bereits gut charakterisiert (Pokorny et al., 2005; Song et al., 2006; Klar et al., 2007). Über die Funktion von Cryptochrom 3 *in vivo* war dagegen bisher nichts bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die biologische Funktion von cry3 in der Pflanze zu untersuchen. Dies sollte zunächst über weitere Lokalisationsstudien und die Analyse der *CRY3*-Expression auf RNA- und Proteinebene in *Arabidopsis thaliana* erfolgen. Zudem sollte durch den Vergleich von cry3-Mutanten mit Wildtyp-Pflanzen die biologische Funktion aufgeklärt werden. Dazu sollten Überexpressionslinien sowie RNAi-Linien hergestellt werden und verschiedene Mutantenkollektionen auf Insertionen im *CRY3*-Gen überprüft werden. Die Mutanten waren dann auf zahlreiche Wachstums- und Entwicklungsparameter zu überprüfen. Insbesondere waren dabei lichtabhängige Prozesse zu berücksichtigen, um eine mögliche Funktion von cry3 als Photorezeptor in der Pflanze nachzuweisen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde bekannt, dass cry3 in der Lage ist, CPD-Schäden in einzelsträngiger DNA und in Loop-Strukturen von doppelsträngiger DNA *in vitro* zu reparieren (Selby und Sancar, 2006; Pokorny et al., 2008). Daher sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob cry3 in der Pflanze möglicherweise ebenfalls eine Funktion als DNA-Reparaturenzym ausübt, welche möglicherweise auf Organellen beschränkt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprachen alle dem Reinheitsgrad p.A. (zur Analyse). Sie wurden hauptsächlich von den Firmen Sigma, Roth und Applichem bezogen. Davon abweichende Hersteller werden gesondert bei der jeweiligen Verwendung erwähnt.

2.1.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Magnetrührer	RCT basic	Staufen
Schüttler	Multitron Version 2	Infors AG, Einsbach
Tischschüttler	Typ 3005	Gesellschaft für Labortechnik MBH, Burgwedel
pH - Meter	Microprozessor pH/ION-Meter pMX 2000	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Photometer	UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer	Shimadzu
Fluoreszenzspektrometer	RF-5301 PC	Shimadzu
Sterilbank	Aura H 130	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen
Zellmühle	MM 200	Retsch, Haan
Zentrifugen	Biofuge 13 Biofuge pico Labofuge 400 R J2-21 Centrifuge Centricon T-1080 Hermle Z360 K	Kendro, Langenselbold Kendro, Langenselbold Kendro, Langenselbold Beckmann Coulter, Krefeld Kontron Instruments Eppendorf, Hamburg
Folienschweißgerät	Vakupak	Krups
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
realtime PCR-Cycler	realpex	Eppendorf
Spannungs-/ Stromquelle	Power 300 Electrophoresis Power Supply	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Blotapparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad München
Digitalkamera	Coolpix 5000	Nikon

2.1.3 Oligonukleotide

Primer für cry3-Überexpression zum Einfügen von NcoI bzw. BamHI Schnittstellen		
#1 (30.09.04)	5' - ccATGG CGG CTT CCT CTC TCT CG -3'	NcoI
#2 (30.09.04)	5'- ggatcC TAA GG ACC ATT GTG TCT AGA AC - 3'	BamHI
Primer für CRY3-RNAi-Konstrukt zum Einfügen von Schnittstellen		
#8 (30.04.04)	5' - aatctaga ggcgcgccGA CTT GCC TGA TGT CTA C -3'	XbaI - Ascl
#9 (30.04.04)	5' - aa_ggatcc atttaaatTC TTG GCT CCA CTT CCC TTG - 3'	BamHI - SwaI
CRY3		
#1 (29.10.04)	5'- CCA CAA CTC GTC AAA ACA CAA ACA CCA -3'	gen. DNA: 574 bp
#3 (29.10.04)	5'- CCA AAC ATT CCA TAA GAA AAC CGC CTC -3'	cDNA: 500 bp
Transposon primer (Test von Δcry3 auf homozygote Linie)		
#1 (16.10.06)	5' - TCC GTT CCG TTT TCG TTT TTT AC - 3'	Kombination mit CRY3 Primern
#2 (16.10.06)	5' - CCG GAT CGT ATC GGT TTT CG - 3'	
aph4 - (Segregationsanalyse Δcry3)		
#1 (19.03.08)	5' – CGA TGT AGG AGG GCG TGG ATA TGT – 3'	323 bp
#2 (19.03.08)	5' – ATG TAG TGT ATT GAC CGA TTC CTT GCG – 3'	
Primer zum Test der CRY3-Tilling-Linie		
#1 (13.09.06)	5' - GCA AGG GAA GTG GAG CCA AGA T - 3'	WT: 473 bp
#2 (13.09.06)	5' - GAT CAT TTC CAA CTC CTT CAA TGG TA - 3'	
Primer für realtime PCR		
CRY3		
#1 (07.03.05)	5' - ACC CCT TTC TTC CTC TTC TCT GTT CC - 3'	172 bp
#3 (07.03.05)	5' - CGT TAC TCC TTT CCC CTT TCT CTT A - 3'	
CRY3 (keine Amplifikation von genom. DNA)		
#1 (28.06.05)	5' - CAG CAT TCC CAA GCA AGC ACA AAA C - 3'	180 bp (nur für cDNA)
#2 (28.06.05)	5' - CCA GAC TTT GAC CCT CCA GCC ATT G - 3'	
UBQ 10 (housekeeping Gen)		
#4 (16.10.06)	5' - CGG GAA AGA CGA TTA CTC TTG AGG - 3'	145 bp
#5 (16.10.06)	5' - GCA AGA GTT CTG CCA TCC TCC - 3'	
pFGC5941 T-DNA-Primer (Bestimmung der Insertionszahl)		
#3 (28.06.05)	5' - CTT GGC GTG TCA GCG TAT CTA TTC A - 3'	132 bp
#4 (28.06.05)	5' - ATT TGG TCG TTT ATT TCG GCG TGT A - 3'	
psbA (D1- Protein)		
#1 (24.03.06)	5' - ATA GAT CAA GAA AAC AGC AGT CGC AGC - 3'	106 bp
#2 (24.03.06)	5' - TAT GGG TCG TGA GTG GGA ACT TAG TT – 3'	

psbD (D2 - Protein)		
#3 (24.03.06)	5' - GGT CTA TTG CTC TTT CCT TGT GCC TAT T - 3'	185 bp
#4 (24.03.06)	5' - GGA CCC CAC AGT AAC AAC AAA GAA TGC -3'	
rbcL - RUBISCO (gr. UE)		
#5 (24.03.06)	5' - TCT TGG CAG CAT TCC GAG TAA CTC CT -3'	154 bp
#6 (24.03.06)	5' - ATG TGG TAG CAT CGT CCT TTG TAA CG -3'	
psaA (PS1 A1-Protein)		
#7 (24.03.06)	5' - TCC GCC CAC ATC TCC ATT CAG G -3'	145 bp
#8 (24.03.06)	5' - TCT TTG GCT GAG TGG CAT GTA TTT CC -3'	
rsp4 (ribosomal protein S4)		
#1 (31.05.06)	5'-CAT CCT TCA CTG TAA TAA TAT CTC GGG GT -3'	132 bp
#2 (31.05.06)	5' - GAT TGG GTA TGG CTT TGA CTA TTC CTC -3'	
psbD BLRP 950 bp transcript		
#3 (31.05.06)	5' - GAT TCG AGA ACA TAA CAA GAT CCT ACA TTC - 3'	165 bp
#4 (31.05.06)	5' - CTC ACA TAC ACC TTC GAT CAC ATT ACA TT - 3'	
Actin 2 (housekeeping Gen)		
#3 (04.04.07)	5' - ACC CTG TTC TTC TTA CCG AGG CTC C - 3'	gen. DNA: 256 bp
#3 (04.04.07)	5' - ACA CCA TCA CCA GAA TCC AGC - 3'	cDNA: 178 bp
SAND (At2g28390 - housekeeping Gen)		
#9 (08.02.08)	5' - TCT CCA TCC CGA TGA CTT GCT TCT AC - 3'	gen. DNA: 221 bp
#10 (08.02.08)	5' - ATC ATC ATC AAA GAA GTG GAC ATA GGC A - 3'	cDNA: 148 bp
PPR repeat (At1g62930 - housekeeping Gen)		
#11 (08.02.08)	5' - GCA AGA TGA TGA AAC TCG GCT ATG AGC - 3'	148 bp
#12 (08.02.08)	5' - AAT GTG ACG GTA TTG GGT TGA TAC TCC - 3'	
GA3ox1 (At1g15550)		
#1 (08.02.08)	5' - GTC CGA AGG TTT CAC CAT CAC TGG - 3'	gen. DNA: 595 bp
#2 (08.02.08)	5' - CTG ACC CCA AGT GAA TTT AGT GCT AAC C - 3'	cDNA: 162 bp
GA3ox2 (At1g80340)		
#3 (08.02.08)	5' - CGA AGG TTT CAC CGT TAT TGG CTC TCC - 3'	gen. DNA: 605 bp
#4 (08.02.08)	5' - GCC CAT TGT ATG TCC TTT TCT TCA ACT C - 3'	cDNA: 180 bp
GA2ox2 (At1g30040)		
#5 (08.02.08)	5' - ATC TCC TCC TCA ATG CTA ATC CTC AGC - 3'	gen. DNA: 385 bp
#6 (08.02.08)	5' - CAG AGT GTC CCT TGG CTC TAT CCC TA - 3'	cDNA: 179 bp

Primer für UV-Schäden assay		
psaA - Chloroplasten		
#2(15.07.08)	GAT CTA ATC CGC CAC GAA AAG TAA GAA A	713 bp
#5(15.07.08)	CAC TTG GAT CTG GAA CCT ACA TGC TGA	
GA3ox1 - genom. DNA		
#1 (08.02.08)	5' - GTC CGA AGG TTT CAC CAT CAC TGG – 3'	595 bp
#2 (08.02.08)	5' – CTG ACC CCA AGT GAA TTT AGT GCT AAC C – 3'	
nad4 - Mitochondrien		
#11 (22.01.07)	5' - TTC GCC GTC AAA GTG CCT ATG GT - 3'	692 bp
Nad4 #1	5' - CGC TTT TCG TTC ATT TTC GCC AC - 3'	
25 S rRNA - genom. DNA		
#1 (17.12.08)	5' - TCC CTT AGT AAC GGC GAG CGA AC - 3'	704 bp
#4 (17.12.08)	5' - CTT CTC AGA AGA TCA AGG TCG GTC G - 3'	

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Antigen	Quelle	Bezugsquelle	Bemerkungen
α CRY3 #503	rekombinantes cry3	Kaninchen	Eurogentech	Affinitätsreinigung von α CRY3 #503
α CRY3 SA4288	rekombinantes cry3	Kaninchen	Eurogentech	1:1000
α CAB	Chlorophyll A/B bindende Proteine aus <i>Sinapis alba</i>	Maus	Tim Kunkel, Universität Freiburg	1:2000
α DnaK	mitochondriales DnaK (HSP68) aus <i>Lycopersicon spec.</i>	Kaninchen	Prof. L. Nover, Universität Frankfurt	1:3000
α POM34	mitochondriales Porin aus Kartoffel	Kaninchen	Prof. H.-P. Braun, Universität Hannover	1:1000
α rabbit IgG HRP-Konjugat	Kaninchen IgG	Ziege	Sigma-Aldrich (A-6154)	1:10 000
α mouse IgG HRP-Konjugat	Maus IgG	Ziege	Sigma-Aldrich (A-4416)	1:10 000

2.1.5 Größenmarker

Proteinmarker: SDS-7b Markervorgefärbtes Poly-peptidgemisch; apparentes Molekulargewicht: 31.5; 33.5; 53; 62.5; 86; 112.5; 172.5 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Marker: λ DNA/Eco47I (Avall)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Fotomaterialien

Hyperfilm ECL™	amersham pharmacia biotec, Buckinghamshire, England
Röntgenfilm-Entwickler: Kodak GBX developer and replenisher	bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Röntgenfilm-Fixierer: Kodak GBX fixer and replenisher	bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.7 Plasmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pGEM-T	Zwischenvektor für Klonierungen und Sequenzierungen	Promega
pFGC5941	binärer Vektor für <i>Arabidopsis</i> -Transformation mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NASC

2.1.8 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration	Hersteller
Kanamycin	50 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Roth
Gentamycin	10 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Duchefa
Rifampicin	25 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Duchefa
Hygromycin	50 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Calbiochem
Ampicillin	100 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Roth

2.1.9 Pflanzenhormone

Hormon	Hersteller
Gibberellin	Sigma
Abscisinsäure	Sigma

2.1.10 Verwendete Organismen

Bakterienstämme

Escherichia coli	
XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F' <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10</i> (Tet ^r)]
XL10-Gold (Stratagene)	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]
Agrobacterium tumefaciens	
GV3101::pMP90	Chromosomales Resistenzgen: Rifampicin Resistenzgen auf Ti-Plasmid: Gentamycin

Arabidopsis thaliana Obwohl *Arabidopsis thaliana* eine wirtschaftlich unbedeutende Pflanze ist, kann ihre Bedeutung als Modellpflanze nicht bestritten werden. Die Erforschung von *Arabidopsis* geht zurück bis ins Jahr 1907 (Übersicht in Somerville und Koornneef 2002). Diese weit verbreitete Pflanze ist eng verwandt mit vielen wichtigen Wirtschaftspflanzen, wie zum Beispiel Raps, Senf und Kohlgewächsen. Die Vorteile von *Arabidopsis thaliana* im Laboralltag sind vor allem ihr kleines Genom von 125 Mb (Megabasen), der kurze Generationszyklus von etwa 6 Wochen, der geringe Platzbedarf bei hohem Samenertrag sowie die Verfügbarkeit eines effizienten Transformationssystems mittels *Agrobacterium tumefaciens*. Zudem steht seit 2000 die Genomsequenz von *Arabidopsis* zur Verfügung (Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000). Die Bedeutung von *Arabidopsis* in der Forschung hat in den letzten Jahren immer weiter zugenommen und es steht eine große Anzahl an unterschiedlichen Mutantenlinien bereit (Übersicht in Somerville und Koornneef 2002).

Verwendete *Arabidopsis*-Linien:

Wildtyp	
Ler	Landsberg erecta
Col	Columbia (<i>glabrous</i> , ohne Trichome)
Col-0	Columbia-0
Nos	Nossen

Mutanten und transgene Linien			
	Beschreibung	Hintergrund	Quelle
cry3ox	Überexpressionslinie cry3	Ler	diese Arbeit
<i>CRY3</i> RNAi	<i>CRY3</i> -RNAi-Linie (<i>CRY3</i> -Menge reduziert)	Col	diese Arbeit
Δ cry3	cry3-Transposoninsertion (<i>knock-out</i>)	Nos	Riken Institut, Japan
5' T-DNA	T-DNA-Insertion im CRY3-Promotorbereich	Col-0	Koncz, MPIZ Köln
GK (T-DNA)	T-DNA-Insertion im letzten CRY3 Exon (423F01)	Col-0	GABI-Kat, NASC
<i>pif1-2</i>	<i>pif1 knock-out</i> -Linie	Col-0	Prof. Apel, Zürich
Δ <i>phr</i>	Klasse II CPD-Photolyase <i>knock-out</i>	Ler	ABRC, Landry et al., 1997
phr ox	Klasse II CPD-Photolyase- Überexpressionslinie	Ler	Kaiser et al., 2009

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Anzucht auf Erde Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte für die meisten Experimente auf einem Gemisch aus Erde und Vermiculit. Zur Aussaat wurde eine entsprechende Menge Samen auf die Töpfe mit diesem Gemisch verteilt. Nach 3 Tagen Stratifikation im Dunkeln bei 4-6°C wurden die Samen den entsprechenden Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte dies in einem Klimaschrank mit einem 12 h Weißlicht/ 12 h Dunkel-Zyklus. Die Lichtintensität betrug ca. 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Während der Lichtphase betrug die Temperatur der Klimakammer 22°C und wurde in der Dunkelphase auf 18°C abgesenkt.

Anzucht auf Filterpapier Etiolierte *Arabidopsis* Keimlinge zur RNA- oder Proteinextraktion wurden in "Gerda-Dosen" (transparente Plastikdosen, 8 x 8 x 5 cm (L x B x H)) auf feuchtem Filterpapier angezogen. Die Dosen wurden mit 3 Lagen *blotting* Papier MN 218 (Macherey & Nagel) ausgelegt. Das Papier wurde mit Wasser getränkt und das überschüssige Wasser wieder abgegossen. Die Samen wurden schließlich gleichmäßig auf dem Filterpapier verteilt. Die geschlossenen Dosen wurden daraufhin zur Stratifizierung der Samen für 3 Tage bei 4-6°C gelagert. Zur Keimungsinduktion mussten die Samen zunächst noch für 2-4 h mit Weißlicht bestrahlt werden, bevor sie während der nächsten Tage im Dunkeln zu etiolierten

Keimlingen heranwachsen konnten. Die Ernte der Keimlinge erfolgte nach entsprechender Wachstumszeit von meist 3-5 Tagen. Die Keimlinge wurden dazu mitsamt dem Filterpapier in flüssigem Stickstoff gekühlt, um dann mit einem vorgekühlten Spatel abgekratzt zu werden. Um ein zwischenzeitliches Auftauen der Keimlinge zu verhindern, wurde ein Stück Aluminiumfolie mit flüssigem N₂ gefüllt und die Keimlinge fielen bei der Ernte vom Filterpapier direkt in den Stickstoff. Direkt nachdem der Stickstoff abgedampft war, wurden die Keimlinge in der Folie eingeschlossen und erneut im Stickstoff gekühlt und bei -70 °C gelagert.

Anzucht auf Platten *Arabidopsis*-Keimlinge wurden ebenfalls auf $\frac{1}{2}$ MS Phytoagar-Platten angezogen. Für 500 ml MS-Medium wurde 1,075 g MS und 0,25 g MES zunächst in 400 ml H₂O gelöst und mit 1 M KOH-Lösung auf pH 5,7 eingestellt. Nach Zugabe von 4 g Phytoagar wurde das Medium auf 500 ml aufgefüllt und für 20 min autoklaviert. Bei Verwendung der Platten zur Selektion mit Hygromycin wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 200 µl einer sterilfiltrierten Hygromycin-Lösung ($50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) zugegeben. Die Endkonzentration betrug somit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Nachdem das Medium auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden die Platten gegossen. Vor der Aussaat wurden die Samen, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, oberflächensterilisiert, in 0,15% Phytoagar resuspendiert und mit einer Pipette auf den Platten verteilt. Die geöffneten Platten wurden in der Sterilbank kurz getrocknet, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Schließlich wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und nach Stratifikation bei 4-6 °C den entsprechenden Wachstumsbedingungen ausgesetzt.

Bestrahlungsbedingungen Vom Weißlicht abweichende Bestrahlungsprogramme wurden meistens unter Verwendung von Lichtfeldern durchgeführt. Folgende Lichtfelder wurden in dieser Arbeit verwendet (Schäfer, 1977):

Lichtfeld	$\lambda(\text{max})$	HW (spektrale Bandbreite)	Fluenzrate
Blaulicht-Feld	436 nm	43 nm	$40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Rotlicht-Feld	656 nm	24,5 nm	$21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Dunkelrot-Feld	730 nm	128 nm	$6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
UV-A	360 nm	40 nm	$70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
UV-B	Lampen: Philips TL 40W / 12 (280-350nm)		

Zur monochromatischen Bestrahlung von Proben wurden Doppel-Interferenz-Linienfilter (Schott, Mainz) im Strahlengang von Diaprojektoren verwendet. Die Lichtintensität wurde dann den Anforderungen entsprechend eingestellt. Die Fluenzraten von monochromatischen Lichtquellen wurden mit einem Optometer von Gigahertz optik (model BN-9201.2-TF) bestimmt. Zur Messung der Lichtintensität von Weißlichtquellen wurde ein LI-COR LI-185B Lichtmessgerät verwendet.

2.2.2 Oberflächensterilisation von Samen

Um *Arabidopsis*-Pflanzen auf Agar-Platten anzuziehen, wurde die Oberfläche der Samen zuvor sterilisiert. Dadurch wurde eine Kontamination der Platten mit Pilzen oder Bakterien verhindert. Zur Sterilisation wurde eine entsprechende Menge Samen zunächst mit 70%igem Ethanol und dann für 10 min mit Sterilisations-Lösung (5% Hypochlorit; 0,1% Triton X-100) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gewaschen. Die Samen sedimentieren nach kurzer Zeit selbständig, so dass der Überstand mit einer Pipette abgenommen werden konnte. Um alle Reste der Sterilisationslösung wieder zu entfernen, wurden die Samen anschließend 3x mit sterilem Wasser gewaschen. Zur Aussaat wurden die Samen schließlich in einer sterilen 0,15% Phytoagar-Lösung resuspendiert. Die Samen wurden in dieser Lösung mit einer Pipette auf die Platten verteilt.

Da die Samen für die Keimungsexperimente vor der Aussaat nicht quellen durften, wurden sie in diesem Fall für 10 min mit 100%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Abnehmen des Ethanols wurden die Samen in der Sterilbank an der Luft getrocknet und später direkt für die Aussaat auf die Wasser-Agar-Platten für die Keimungsversuche verwendet.

2.2.3 Keimungsversuche

Nachzucht für Keimungsversuche Die Wachstumsbedingungen der Mutterpflanzen, das Alter der Samen und die Art der Samenlagerung haben einen großen Einfluss auf die Keimungsfähigkeit der Samen. Um geeignete Samen für die Keimungsversuche mit *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, mussten die Mutterpflanzen der einzelnen Pflanzenlinien alle zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen angezogen werden. Auch die Samen wurden gleichzeitig geerntet und unter gleichen Bedingungen gelagert.

Von jeder zu untersuchenden Pflanzenlinie wurden 6-8 Einzelpflanzen angezogen. Die Samen dieser Pflanzen wurden separat geerntet und für eine unabhängige Mehrfachbestimmung der einzelnen Linien verwendet. Die Ernte der Samen erfolgte sobald die Schoten der Pflanzen getrocknet waren und eine braune Farbe angenommen hatten. Die Samen wurden vom restlichen Pflanzenmaterial durch ein Sieb mit 200 µm Maschenweite getrennt. Zudem wurden kleine und unterentwickelte Samen durch ein 50 µm Sieb abgetrennt und verworfen. Die Samen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Aussaat im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Aussaat und Keimung Die oberflächensterilisierten Samen (Abschnitt 2.2.2) wurden für die Keimungsversuche auf 0,9% Phytoagar-Platten ohne weitere Zusätze ausgesät. Jeweils 30 - 100 Samen von 6 einzelnen Mutterpflanzen wurden für jede Pflanzenlinie verwendet. Jede Platte wurde unterteilt, so dass pro Platte 6 unterschiedliche Samen-Chargen ausgesät wurden. Um den Einfluss von kleinen Unterschieden einzelner Platten auf die Samenkei-

mung auszuschließen, wurden die Samen der unterschiedlichen Pflanzenlinien gleichmäßig auf mehrere Agar-Platten verteilt. Direkt nach der Aussaat wurden die Samen für 1 h dunkel gestellt und anschließend für 4 min mit monochromatischem Dunkelrot-Licht (750 nm; $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Dadurch wird die aktive P_{FR} -Form von Phytochrom B in den Samen reduziert und somit wird die Dunkelkeimung auf ein Minimum reduziert. Die Samen wurden direkt nach der DR-Bestrahlung lichtdicht verpackt und für 3 Tage bei 4-6 °C stratifiziert. Nach dieser Zeit erfolgte die Induktion der Samenkeimung mit dem jeweiligen Lichtprogramm. Die Keimungsrate wurde nach weiteren 4 Tagen bei 18 °C bestimmt. Alle Samen, bei denen die Samenschale bereits von der Radicula durchbrochen worden war, wurden als gekeimt gewertet.

2.2.4 Bestimmung der Pigmentzusammensetzung

Chlorophyll-Bestimmung durch Absorptionsspektroskopie Zur Chlorophyll-Bestimmung wurden die Pigmente aus *Arabidopsis* Keimlingen oder adultem Blattmaterial mit N,N'-Dimethyl-Formamid (DMF) extrahiert. Dazu wurde das Material für ca. 2 h in 1 ml DMF im Dunkeln geschüttelt, bis die Pigmente vollständig extrahiert waren. Der Pigment-Extrakt wurde mit einer Pipette entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von diesen Extrakten wurden dann Absorptionsspektren im Bereich von 350 bis 720 nm aufgenommen. Unter Verwendung der einzelnen Extinktionskoeffizienten lässt sich aus den Spektren mit folgenden Formeln nach Porra (2002) die Menge von Chlorophyll A und B bestimmen:

- $\text{Chl a [mg/l Lösungsmittel]} = 12,00 \times E_{663,8} - 3,11 \times E_{646,8}$
- $\text{Chl b [mg/l Lösungsmittel]} = 20,78 \times E_{646,8} - 4,88 \times E_{663,8}$
- $\text{Chl a + b [mg/l Lösungsmittel]} = 17,67 \times E_{646,8} + 7,12 \times E_{663,8}$

Pigment-Bestimmung durch Fluoreszenzspektroskopie Die Pigmentzusammensetzung in etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen wurde durch Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie weist die Fluoreszenzspektroskopie eine wesentlich höhere Sensitivität auf. Dadurch konnte die Pigmentzusammensetzung in einem DMF-Extrakt aus nur 10 etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen analysiert werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 433 nm wurde ein Emissionsspektrum im Bereich von 600 bis 720 nm aufgenommen. Das Emissionsmaximum von Protochlorophyllid beträgt 624 nm, Chlorophyll hat sein Emissionsmaximum dagegen bei 663 nm. Daher kann man durch Fluoreszenzspektroskopie die Umwandlung von Protochlorophyllid zu Chlorophyll in etiolierten Keimlingen gut beobachten.

2.2.5 Bestimmung der Hypokotyllänge und Kotyledonenfläche

Zur Messung der Hypokotyllänge und Kotyledonenfläche wurden die Keimlinge bzw. Kotyledonen inklusive einem Längenstandard mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Längen der Hypokotyle und die Flächen der Kotyledonen wurden dann anhand des Längenstandards mit dem Programm *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) quantifiziert. Aus ca. 15 Einzelmessungen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden 7 Tage alte *Arabidopsis* Keimlinge in 1% Glutaraldehyd fixiert. Durch Anlegen eines Unterdrucks im Exsikkator wurden kleine Luftbläschen entfernt, so dass die Keimlinge in der Glutaraldehyd-Lösung nach unten sanken. Nach der Entwässerung des Gewebes mit einer aufsteigenden Ethanolreihe erfolgte die Einbettung in *Lowicryl* Harz. Mit einem Microtom wurden daraus schließlich Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden mit dem affinitätsgereinigten cry3-Antikörper #503 (Meier, 2004) in einer 1:50 Verdünnung inkubiert. Zur Detektion erfolgte eine weitere Inkubation mit goldgekoppeltem Sekundärantikörper (1:150) gegen Kaninchen Immunglobuline. Die Proben wurden dann mit dem Elektronenmikroskop analysiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterienkulturen wurden in der Regel auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (Abschnitt 2.1.8) angezogen. Dazu wurden die Kulturen mit einer sterilen Impföse auf die Platten ausgestrichen. Die Platten mit *E. coli* wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, die *Agrobakterien* inkubierten jedoch für 3 Tage bei 28°C. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 3 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika mit einer einzelnen Kolonie von der Platte inokuliert und für 24 h bei 37°C bzw 28°C schüttelnd (250-300 rpm) inkubiert.

Gefrierkultur Zur Herstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurden 500 µl einer Vorkultur mit 500 µl einer 75%igen Glycerinlösung gemischt und bei -70°C eingefroren. Zur Reaktivierung der Kultur wurden die tiefgefrorenen Zellen mit einer Impföse entnommen und auf LB-Platten bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die Gefrierkultur wurde ohne aufzutauen zur weiteren Verwendung wieder bei -70°C gelagert.

2.3.2 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* (Minipräparation)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt. Dazu wurden zunächst 3 ml LB-Flüssigkultur mit einer *E. coli* Einzelkolonie in-

okuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 100 µl GTE / RNase-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH / SDS-Lösung erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min, nachdem 150 µl PAS zugegeben worden waren und die Probe kurz gevortext worden war. Der Überstand nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13 000 rpm wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde dem Überstand 1 ml 100%igem Ethanol (-20°C) zugegeben und die Präparation wurde für 2 min bei RT inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde schließlich in 20-50 ml TE- oder EB-Puffer resuspendiert.

Puffer und Lösungen	
GTE / RNase	50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8.0; 10 mM EDTA; 0,02 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ RNase (autoklavieren, bei 4°C lagern)
NaOH / SDS	0,1 oder 0,2 N NaOH; 1% SDS
PAS (100 ml)	29,5 ml Essigsäure; KOH-Plättchen zugeben bis pH 4,8; mit dest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen (nicht autoklavieren, bei RT lagern)

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektroskopische Konzentrationsbestimmung Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Zur Konzentrationsbestimmung wurde daher die Absorption einer Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm photometrisch bestimmt. Dazu wurden die UV-durchlässigen Küvetten *UVette*[®] von Eppendorf mit 60 µl einer verdünnten Nukleinsäurelösung verwendet. Die Verdünnung der zu bestimmenden Lösung wurde so gewählt, dass die Absorption kleiner als 1 war. Nur in diesem Bereich besteht nämlich ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration der Lösung. Die Konzentration der Ausgangslösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor}$$

	Multiplikationsfaktor
dsDNA (doppelsträngige DNA):	50
RNA:	40
ssDNA (einzelssträngige DNA):	37

Um die Nukleinsäurelösungen auf Verunreinigungen mit Proteinen zu überprüfen, wurde das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ berechnet. Aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Bei einer reinen DNA-Lösung beträgt dieses Verhältnis ca. 1,8.

Diese Methode ist nicht geeignet, um die Konzentrationen von Gemischen aus verschiedenen Nukleinsäuren zu bestimmen. Die Konzentration von PCR-Produkten kann ohne vorausgehende Aufreinigung also nicht gemessen werden, da die eingesetzten Primer und dNTPs ebenfalls bei 260 nm absorbieren.

Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese Die Agarose-Gelelektrophorese wurde als weitere Methode zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration einer Lösung genutzt. Dazu wurde die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz der DNA-Banden mit DNA-Standards bekannter Konzentration verglichen. Als DNA Standard wurde dabei der λ -DNA/-Eco471(Avall)-DNA-Marker verwendet. In der Regel wurden dazu 10 μ l Marker (500 ng) und 1 μ l DNA-Probe in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die DNA-Probe war zuvor mit Wasser und Probenpuffer auf 10 μ l aufgefüllt worden.

Konzentrationsbestimmung durch Fluoreszenzspektroskopie Diese Methode der Konzentrationsbestimmung wurde verwendet, um DNA-Proben auch in Gegenwart von kontaminierender RNA quantifizieren zu können. Da RNA das gleiche Absorptionsmaximum wie DNA aufweist, lassen sich solche Proben ohne vorherige RNase-Behandlung durch Absorptionsmessung nicht korrekt quantifizieren. Bei der Konzentrationsbestimmung durch Fluoreszenzspektroskopie (Labarca und Paigen, 1980) wurde jedoch der DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 verwendet. Dieser Farbstoff besitzt nur eine geringe Affinität zu RNA oder Proteinen, so dass auch die DNA-Konzentration in Nukleinsäuregemischen problemlos bestimmt werden kann.

Von dem Fluoreszenzfarbstoff wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ vorbereitet. Diese Stammlösung wurde für alle weiteren Messungen bei 4°C im Dunkeln gelagert. Für eine gebrauchsfertige Lösung wurde die Stammlösung 1 : 10 000 mit TNE-Puffer auf 0,1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verdünnt. Die Messung erfolgte in speziellen Fluoreszenzküvetten mit einem Probenvolumen von 100 μ l. Dazu wurden 110 μ l Hoechst Lösung mit 1 μ l DNA-Lösung gemischt und mittels eines Fluoreszenzspektrometers die Emission bei 450 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm. Für eine absolute Quantifizierung der DNA wurde zudem eine Eichkurve erstellt. Als Standard-DNA wurde dazu hochmolekulare *calf thymus* DNA verwendet. Die Verwendung von niedermolekularer DNA führt hierbei zu falschen Werten, da der Farbstoff nur an DNA von mindestens 200 bp Länge effizient bindet.

Puffer und Lösungen	
Hoechst 33258	Sigma
<i>calf thymus</i> DNA	Sigma
TNE-Puffer	10 mM Tris / HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 1mM EDTA

2.3.4 Restriktion von DNA

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 0,2 - 1 µg der zu untersuchenden DNA (1-5 µl) eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl Restriktionsenzym (10 U) und entsprechender Menge Wasser und Puffer wurde der Ansatz mit einem Endvolumen von 20 µl für 1 h bei 37°C verdaut. Bei entsprechender Kompatibilität bezüglich der Pufferbedingungen konnten in einzelnen Ansätzen mehrere Restriktionsendonukleasen gleichzeitig verwendet werden. Dabei war zu beachten, dass die Menge der Enzymlösungen nicht mehr als $\frac{1}{10}$ des Gesamtvolumens ergab. Zur Analyse folgte nach der Restriktion die Gelelektrophorese der geschnittenen DNA-Fragmente.

Bei präparativen Restriktionsansätzen wurde in der Regel ein größeres Volumen zum Verdau angesetzt. Die Enzym-Menge wurde dabei allerdings um die Hälfte reduziert und der Verdau erfolgte bei entsprechender Temperatur über Nacht. Nach der Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung aus dem Gel isoliert.

2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Kit von Qiagen verwendet. Die Extraktion und Aufreinigung der Fragmente basiert auf einer Solubilisierung der Agarose und der quantitativen Bindung der Nukleinsäuren an Silicagel-Partikel unter Hochsalzbedingungen. Die Elution erfolgt dann bei geringem Salzgehalt durch Zugabe von Wasser oder Puffer.

Die aufzureinigenden Banden aus den 1-2%igen Gelen wurden zunächst am UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten. Vor der Überführung in 2 ml Reaktionsgefäße wurde überschüssige Agarose entfernt. Das Gewicht der Agarose-Stücke wurde bestimmt und die passende Menge an Solubilisierungspuffer zugegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte dann entsprechend den Herstellerangaben. Die DNA wurde schließlich mit EB-Puffer (10 mM Tris/-HCl, pH 8,5) eluiert.

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wurden zwei DNA-Fragmente mit passenden Überhängen miteinander verknüpft. In diesem Fall handelte es sich um ein *insert*, das in einen speziellen Vektor kloniert werden sollte. Vektor und *insert* waren zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten worden, um passende Überhänge zu erzeugen. Die Verknüpfung der freien 3'OH-Gruppe mit der freien 5'Phosphat-Gruppe erfolgte durch die T4-Ligase.

Die Ligation wurde in einem 15 µl Ansatz durchgeführt, wobei jeweils entsprechende Mengen von Wasser, Vektor, *insert*, 10x Ligasepuffer und PEG mit 1 µl T4 Ligase gemischt wurden. Es wurden 30-50 ng des Vektors und ein 5-facher molarer Überschuss an *insert* DNA verwendet. Zur Berechnung der einzusetzenden *insert* Menge wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{insert [ng]} = \frac{5 \times \text{Vektor [ng]} \times \text{insert [bp]}}{\text{Vektor [bp]}}$$

Die Ligation erfolgte für 1 h bei 22 °C im Wasserbad.

2.3.7 Transformation von *E. coli*

Herstellung von kompetenten Zellen mit der CaCl₂-Methode Vor der Transformation von *E. coli* mit Ligationsansätzen oder Plasmid-DNA mussten Transformations-kompetente Zellen hergestellt werden. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit einer Vorkultur angeimpft und bei 18 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Eis gekühlt und mit einer Beckmann Kühlzentrifuge bei 3000 rpm für 15 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und nochmals für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml der CaCl₂-Lösung resuspendiert und mit 65% iger Glycerin-Lösung auf eine Endkonzentration von 30% Glycerin eingestellt. Die Zellen wurden aliquotiert und dann bei -70 °C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Transformation Zur Transformation der *E. coli* Zellen wurde zunächst ein Reaktionsgefäß mit kompetenten Zellen (100 µl) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3 µl eines Ligationsansatzes bzw. 10-50 ng einer Plasmidpräparation folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach einer Hitzeschock-Behandlung für 1 min bei 42 °C im Heizblock wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Den Zellen wurden dann 900 µl LB-Medium zugegeben und sie wurden für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die gesamte Kultur wurde schließlich auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert, um durch die plasmidvermittelte Resistenz die transformierten *E. coli* Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

2.3.8 Standard-PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen erfolgte durch PCR (*polymerase chain reaction*). Bei analytischen PCR-Reaktionen, z.B. beim Nachweis von transgenen Linien wurde in der Regel Taq-Polymerase verwendet. Bei Klonierungsarbeiten zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurde jedoch *Vent*-Polymerase mit *proof reading* Funktion verwendet, um eine möglichst geringe Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Synthese zu gewährleisten. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Ansatz mit Taq Polymerase		Ansatz mit Vent Polymerase	
H ₂ O	15,3 - x µl	H ₂ O	41,5 - x µl
10x Taq-Puffer (incl. MgCl ₂)	2 µl	10x Vent-Puffer	5 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5 µl	MgSO ₄ (100 mM)	1 µl
5' Primer (10 µM)	1 µl	dNTPs	1 µl
3' Primer (10 µM)	1 µl	5' Primer	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	3' Primer	0,5 µl
DNA-Template (1 - 50 ng)	x µl	Vent-Polymerase (2 U/ µl)	0,5 µl
		DNA-Template	x µl

Die verwendete Zyklenzahl, *annealing*-Temperatur und Synthesezeit wurden an die jeweiligen Anforderungen angepasst. Für eine typische analytische PCR diente jedoch folgendes Temperaturprofil als Grundlage:

<i>Denaturierung:</i>	95°C	5 min	} 31 - 38 Zyklen
<i>Denaturierung:</i>	95°C	35 s	
<i>annealing:</i>	60°C	40 s	
<i>Polymerisation:</i>	72°C	40 s	
<i>Endsynthese:</i>	72°C	5 min	

Ganz-Zell-PCR Die Ganz-Zell-PCR wurde zur Selektion bzw. Überprüfung von positiven *E. coli* Transformanten eingesetzt. Dazu wurde eine frische Bakterienkolonie als *template* mit einer sterilen Pipettenspitze in dem PCR-Ansatz resuspendiert. Die PCR erfolgte dann wie zuvor beschrieben. Bei einem positiven Ergebnis wurde der Rest dieser Kolonie auf der Platte dazu verwendet, um damit das Medium anzuimpfen.

2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem Spannungsfeld anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA wandert dabei als Polyanion durch die Agarose zur Anode. Aufgrund der engen Maschen im Agarosegel wandern kleine Fragmente schneller durch das Gel als große Fragmente. Die Wanderungsstrecke ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Größe der DNA-Fragmente. Um die DNA-Banden später sichtbar zu machen, enthielt das Agarosegel Ethidiumbromid, welches während der Elektrophorese in die DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht rötlich/orange fluoresziert. Zur Auftrennung der relativ kleinen Fragmente von etwa 300 bp wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. 2% (w/v) Agarose wurde mit 1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ethidiumbromid aufgeköcht und unter Rühren auf etwa 60°C abgekühlt. Die flüssige, warme Agaroselösung wurde dann in horizontale Gelkammern gegossen. Zur Ausbildung der Taschen mit einem Probenvolumen von 20 µl wurden Kämme in die noch flüssige

Agarose eingetaucht. Nach dem Aushärten wurden die Gele bis zum Gebrauch in Frischhaltedosen bei 4°C gelagert. Zur Elektrophorese wurden die Gele in den Laufkammern mit TBE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben wurden in die Geltaschen geladen. Die Proben enthielten 25% Probenpuffer, um die spezifische Dichte der Probe zu erhöhen, so dass sie zu Boden sinkt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 10 V/cm für etwa 30 min. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein DNA-Größenmarker verwendet, der zusätzlich zu den Proben im Gel aufgetrennt wurde. Der Marker enthielt die DNA des Phagen Lambda, welche mit dem Restriktionsenzym Ava II geschnitten worden war.

Puffer und Lösungen	
TBE (10-fach)	108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 auf 1 L
Agarose	NEEO Ultraqualität
Ethidiumbromid	1%ige Lösung in A.dest
Probenpuffer	1% SDS, 0.1% Bromphenolblau, 100mM EDTA, 50% Glycerin
λ-DNA / Eco471 (Avall) Marker	0.5 mg DNA/ml; (MBI FERMENTAS, St.Leon-Rot)

2.3.10 Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Genomische DNA-Isolation mit CTAB

Diese Methode basiert auf der Extraktionsmethode von Rogers und Bendich (1985). Für die DNA-Isolation aus *Arabidopsis* wurden zunächst 50 - 300 mg Blattmaterial (3-4 Blätter) oder Keimlinge in einem 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss erfolgte mit der Schwingbechermühle Retsch MM200. Dazu wurden die Proben mit jeweils zwei Stahlkügelchen bei 30 Hz für 2x 35 s aufgeschlossen, wobei die Proben nach dem ersten Lauf nochmal in Stickstoff gekühlt wurden. Nach Zugabe von 300 µl vorgewärmtem 2x CTAB Puffer (65°C) wurde der Zellextrakt mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 10-30 min bei 65°C inkubiert und schließlich für mindestens 5 min auf Eis gekühlt. Nachdem der Extrakt mit 300 µl Chloroform versetzt und gut geschüttelt worden war, folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Gefäße mit 30 µl vorgewärmtem 10x CTAB-Puffer gegeben. Der wässrige Überstand einer weiteren Chloroformextraktion mit 300 µl Chloroform wurde dann in neue 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu 250 µl Präzipitationspuffer gegeben und gut gemischt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm wurde die genomische DNA pelletiert, wobei das Pellet meist nur als dünner Film die Gefäßwand bedeckte. Das Pellet wurde in 200 µl *high salt* TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 400 µl Ethanol und eine Inkubation bei -20°C für 15 min erneut präzipitiert. Die ausgefällte DNA wurde für 15 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und

das Pellet wurde nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet worden war, wurde die genomische DNA in 20-50 µl EB-Puffer resuspendiert.

Puffer und Lösungen	
2x CTAB-Puffer	CTAB (2% w/v), Tris/HCl pH 8 (100 mM), EDTA pH 8 (20 mM), NaCl (1,4 M), Polyvinylpyrrolidon (1% w/v)
10x CTAB-Puffer	CTAB (10% w/v), NaCl (0,7 M)
CTAB-Präzitationspuffer	CTAB (1% w/v), Tris/HCl pH 8 (50 mM), EDTA pH 8 (10 mM)
high salt TE-Puffer	Tris/HCl pH 8 (10 mM), EDTA pH 8 (1mM), NaCl (1 M)

Verkürztes Protokoll zur Isolation von Gesamt-DNA

Dieses verkürzte Protokoll wurde zur Isolation von Gesamt-DNA für den CPD-Reparatur-assay verwendet. Für diese Verwendung war es wichtig, die DNA aller Zellkompartimente aufzureinigen. Da bei diesem assay möglichst lange DNA-Fragmente für eine effiziente DNA-Amplifikation mittels *realtime* PCR benötigt wurden, ist dieses Protokoll nur auf die nötigsten Schritte beschränkt worden. Durch einige Vorversuche konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche RNase-Behandlung mit anschließender Phenol-Extraktion die PCR-Effizienz von Fragmenten mit mehr als 500 bp deutlich beeinträchtigt.

Zur Isolation der DNA wurden 30-100 mg *Arabidopsis* Keimlinge in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit der Schwingbechermühle in gefrorenem Zustand aufgebrochen. Nach Zugabe von 300 µl 2x CTAB Puffer wurde der Extrakt in neue 1,5 ml Gefäße überführt und für 30 min unter gelegentlichem Schwenken bei 65°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Eis gekühlt worden waren, wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und anschließend für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand (meistens 270 µl) wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA wurde durch Zugabe von $\frac{2}{3}$ Volumen (180 µl) Isopropanol gefällt. Nachdem die Extrakte gut gemischt worden waren, folgte direkt im Anschluss eine 15-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm, um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde schließlich einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und, nachdem es an der Luft getrocknet war, in 60 µl TE-Puffer resuspendiert.

Quick DNA-Präparation

Diese DNA-Präparationsmethode wurde bei großem Probenumfang und geringer Probenmenge angewandt. Man erhält kleine Mengen von schlecht aufgereinigter DNA, was jedoch für Standard-PCR-Anwendungen meistens ausreichte. Als Ausgangsmaterial dienten zunächst ca. 50 mg Blattmaterial (3-4 kleine Blätter), welche in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA und 0,5% SDS) mit einem Micro-Pistill zerkleinert wurden. Nach 5 min Zentrifugation wurden 300 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 300 µl Isopropanol dazugegeben und gut

gemischt. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm wurde die DNA pelletiert und der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde schließlich noch einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 80 µl EB-Puffer resuspendiert.

2.3.11 RNA-Isolation

RNA aus *Arabidopsis* Keimlingen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* Keimlingen wurde das *RNeasy Plant mini Kit* von Qiagen verwendet. Die Keimlinge wurden zunächst mit der Schwingbechermühle MM200 von Retsch aufgeschlossen. Dazu wurden maximal 100 mg Pflanzenmaterial in 2 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Die Pflanzen wurden mit 2 Stahlkügelchen und 50 µl RLT-Puffer in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufbruch erfolgte dann zweimal für 30 s bei 30 Hz Schwingungsfrequenz, wobei die Proben zwischendurch nochmals in N₂ gekühlt wurden, um das Auftauen während des Aufbruchs zu verhindern.

Nach dem Zellaufbruch wurden jeder Probe 400 µl RLT-Puffer zugeben und direkt nach dem Auftauen wurden die Proben gut gevortext. Der Zellextrakt wurde dann mit einer Pipette entnommen und auf die *QIAshredder Säule* gegeben. Nach 2 min Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe und Mischen mit 0,5 Volumen absolutem Ethanol wurde der Extrakt auf die RNA-bindende *RNeasy mini Säule* gegeben und für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 700 µl RW1 Waschpuffer überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10 000 rpm für 15 s wurde die Säule anschließend noch zweimal mit RPE-Waschpuffer gewaschen. Um die Säule daraufhin zu trocknen, wurde sie in einem neuen 2 ml Sammelgefäß 1 min bei 13 000 rpm trocken zentrifugiert. Die Elution erfolgte zweimal mit jeweils 30 µl RNase-freiem Wasser.

Zur Quantifizierung der RNA wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]$$

Puffer und Lösungen	
Qiagen RNeasy® Plant mini Kit	
RLT-Puffer	Lysis-Puffer - 10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml RLT jedes Mal frisch vorbereiten
RW1 RPE	Waschpuffer

RNA aus *Arabidopsis* Samen

Da in Samen hohe Konzentrationen von Polysacchariden und anderen Sekundärmetaboliten vorhanden sind, musste das Protokoll für die RNA-Isolation erweitert werden, um eine ausreichende Ausbeute an RNA zu erhalten. Für die Versuche wurden gequollene Samen verwendet, die vor der RNA-Isolation bestimmten Bestrahlungsprogrammen unterzogen wurden. Dazu wurden jeweils 120 - 140 mg Samen (Trockengewicht) auf 3 Lagen feuchtem Filterpapier in Gerda-Dosen (8x8 cm) ausgesät. Nach der Stratifikation und den Bestrahlungsprogrammen wurden die Samen mit einem Spatel vom Filterpapier abgekratzt und in einen mit flüssigem N₂ gekühlten Stahlbecher überführt. Zu 3,5 ml XT-Puffer wurden zunächst 0,07 g PVP; 5,39 mg DTT und 35 µl IGEPAL zugegeben. Die Samen in den Stahlbechern wurden dann mit 500 µl von diesem XT-Puffer und 2 Stahlkugeln (Ø 11 mm) mit der Schwingbechermühle Retsch MM200 aufgebrochen. Nach 5 min bei 30 Hz Schwingungsfrequenz wurde das erhaltene Pulver in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und weitere 500 µl des XT-Puffers zugegeben. Nachdem der Extrakt aufgetaut war, wurden 40 µl Proteinase K hinzugefügt und durch Vortexen gemischt. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 42°C für 90 min. 500 µl der Probe wurden dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 80 µl 2M KCl durch Invertieren vermischt. Nach einer Inkubationszeit auf Eis von 60 min wurde der Extrakt für 20 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 360 µl von 8M LiCl-Lösung gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte dann bei -20°C für mindestens 2 h, wobei diese Inkubation auch bis auf den nächsten Tag ausgedehnt werden konnte. Die RNA wurde schließlich durch 20 min Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C gesammelt und das Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem *cleanup* Protokoll mit dem Qiagen *Plant RNeasy Kit*. Der RNA-Probe wurden 350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol zugegeben. Falls die Probe noch feste Bestandteile enthielt, wurde sie noch durch eine *Qia-Schredder*-Säule zentrifugiert. Mit 250 µl Ethanol vermischt wurde die RNA-Lösung dann auf eine *RNeasy mini* Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPE-Puffer wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und zum Trocknen der Matrix für 2 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 30 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 min bei 10 000 rpm.

Puffer und Lösungen	
XT-Puffer	2,01 g Natriumborat, entwässert (0,2 M); 0,57 g EGTA (30 mM); 0,5 g SDS (1%); 0,5g Na Desoxycholat (1%) mit 10 M NaOH auf pH 9,0 einstellen; DEPC behandeln und autoklavieren. Direkt vor Gebrauch zugeben: Polyvinylpyrrolidon (PVP) (2% Endkonzentration) DTT (10 mM Endkonzentration) IGEPAL CA-630 (1% Endkonzentration)
2 M KCl	DEPC behandelt
8 M LiCl	DEPC behandelt
Proteinase K (PCR grade)	Roche

RNase-freie Lösungen durch DEPC-Behandlung Die DEPC-Behandlung (**Diethylpyrocarbonat**) diente der Inaktivierung von RNasen in Wasser und Lösungen, die bei der Isolation von RNA verwendet wurden. 0,1% DEPC wurde in die zu behandelnde Lösung gegeben und stark geschüttelt, um das DEPC in Lösung zu bringen. Die Lösungen wurden dann für 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 min zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

2.3.12 cDNA-Synthese und reverse Transkription

Verdau von genomischer DNA

Um cDNA-Proben zu erhalten, die für die weitere RT-Analyse geeignet sind, mussten zunächst Reste von genomischer DNA in der RNA-Präparation verdaut werden. Dazu wurde das TURBO DNA-free Kit von Ambion verwendet.

Der Verdau wurde in 25 µl Ansätzen mit einer Gesamt-RNA-Menge von 2,5 µg durchgeführt. Die entsprechende RNA-Lösung wurde dazu mit RNase-freiem Wasser auf eine Gesamtmenge von 22 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 µl 10x DNase-Puffer und 0,5 µl DNase erfolgte der Verdau für 25 min bei 37°C. Zur Inaktivierung der DNase wurde der Ansatz mit 2,5 µl *Inactivation Reagent* gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da sich der Inaktivierungspuffer schnell am Boden absetzt, wurden die Proben während der Inkubationszeit 2-3 mal gemischt. Der Inaktivierungspuffer konnte dann durch 2 min Zentrifugation bei 10 000 rpm pelletiert werden. Vom Überstand wurden jeweils zweimal 11 µl in ein neues 200 µl PCR-Gefäß überführt. Eine Probe diente als Ausgangs-RNA für die reverse Transkription, während die zweite Probe als Negativkontrolle auf genomische DNA für die *realtime* PCR verwendet wurde.

cDNA Synthese

RT Master Mix 1			RT Master Mix 2		
	Endkonzentration	Volumen bei 1x Ansatz		Endkonzentration	Volumen bei 1x Ansatz
random Primer (100 µM)	2,5 µM	0,5 µl	5x first strand buffer	1 x	4 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5 mM	1 µl	DTT (0,1 M)	10 mM	2 µl
			RNase-Inhibitor	20 U	0,5 µl

Für die reverse Transkription wurde die DNase-behandelte RNA-Probe direkt weiter verwendet. Zu den 11 µl RNA wurden 1,5 µl von RT-Master-Mix 1 zugegeben und für 5 min bei 65°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren und das *annealing* der Primer zu ermöglichen. Nachdem der Mix dann wieder auf Eis gekühlt war und die kondensierte Flüssigkeit durch Zentrifugation gesammelt worden war, folgte die Zugabe von jeweils 6,5 µl RT-Master-Mix 2. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37°C wurde dem Mix 0,7 µl reverse Transkriptase zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte dann bei 37°C für 50 min. Um die Reaktion schließlich zu stoppen, wurde die reverse Transkriptase bei 70°C für 15 min inaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei 2-4°C gelagert.

Puffer und Lösungen	
10x TURBO DNase Puffer	Ambion TURBO DNase-free Kit Applied Biosystems
TURBO DNase	
DNase Inactivation Reagent	
5x first strand buffer	Invitrogen
DTT (0,1 M)	
SuperScript II reverse transcriptase (200 U/µl)	
RiboLock Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Fermentas
Random Hexamer Primer (100 µM)	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	

2.3.13 realtime PCR

Zur relativen Quantifizierung von Transkripten und genomischer DNA wurde der Mastercycler® ep *realplex* und der Absolute-QPCR-SYBR-Green-Master-Mix von ABgene® Thermo Scientific verwendet. Für jedes verwendete Primer-Paar wurde ein Mastermix nach folgendem Schema angesetzt:

Mastermix (bei 1x Ansatz)	
H ₂ O	8,5 µl
10x ABsolute QPCR Mix	12,5 µl
5' Primer (10 µM)	1 µl
3' Primer (10 µM)	1 µl

Jeweils 23 µl dieses Mastermixes wurden dann in eine 96-well-Platte pipettiert und es wurde 1 µl der zu untersuchenden cDNA-Probe zugegeben. Die Platte wurde mit einem für *realtime* PCR geeigneten durchsichtigen Klebefilm abgedichtet. Das verwendete PCR-Programm ist in Abbildung 8 dargestellt. Die 15-minütige Phase bei 95°C am Anfang des Programms ist bei Verwendung des ABsolute-PCR-Mixes sehr wichtig, da die Hot-Start-Taq-Polymerase im Mastermix diese Zeit für ihre Aktivierung benötigt. Die Fluoreszenz der Proben wurde jeweils am Ende der Polymerisationsphase der einzelnen Zyklen bestimmt. Am Ende des Programms war die Messung der Schmelzkurve programmiert. Dabei wird die Temperatur der Proben langsam von 60°C auf 95°C in 0,2° Schritten erhöht, wobei nach jedem Schritt die Fluoreszenz gemessen wird.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit den Programmen *realplex* 1.5 und MS Excel. Um die richtige Quantifizierung der Transkriptmengen gewährleisten zu können, wurde für jede zu bestimmende cDNA-Probe zusätzlich zum untersuchten Gen auch die Expression eines *housekeeping* Gens bestimmt. Dadurch können Fehler ausgeglichen werden, die sonst durch unterschiedliche cDNA-Konzentrationen verursacht würden. Als Grundlage für die weitere Auswertung dienten die Ct-Werte der einzelnen Proben. Der Ct-Wert ist die Zyklenzahl, bei der das PCR-Produkt einen festgesetzten Fluoreszenzwert erreicht hat. Dieser Grenzwert wurde so festgelegt, dass sich die Ct-Werte der Proben immer im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion befanden. Als PCR-Effizienz wurde immer der Wert 2 angenommen, also eine Verdopplung pro Zyklus. Eine genauere Bestimmung der PCR-Effizienz für die einzelnen Primerpaare war in dieser Arbeit nicht notwendig, da immer nur ein Gen unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht wurde und der direkte Vergleich der Expression von zwei verschiedenen Genen keine Rolle spielte. Die Bestimmung der relativen Expressionswerte der einzelnen Proben wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$\text{relative Expression} = \frac{2^{\text{Ct-Wert (housekeeping Gen)}}}{2^{\text{Ct-Wert (untersuchtes Gen)}}}$$

2.3.14 Quantifizierung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Die Quantifizierung von DNA-Schäden wurde unter Verwendung der *realtime* PCR durchgeführt. Mit dieser Methode werden alle DNA-Schäden im Zielgen quantifiziert, die eine Amplifikation mittels Taq-Polymerase verhindern. Dies gilt insbesondere für CPD-Schäden, die durch UV-B-Strahlung verursacht werden. Ein Thymin-Dimer verhindert eine weitere Elongation

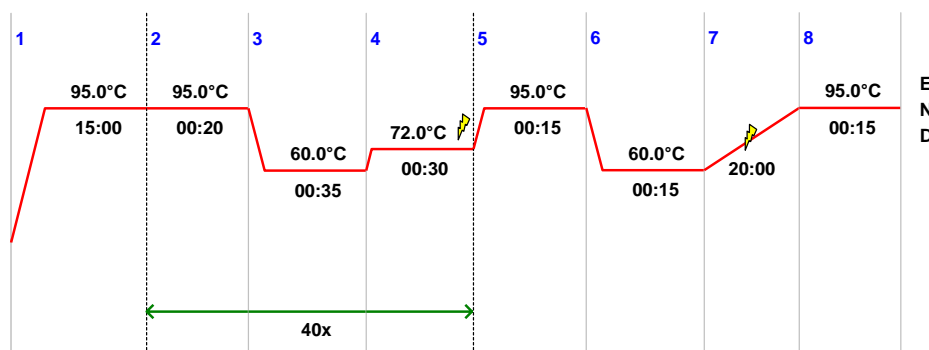


Abbildung 8: Typisches PCR Programm für die Durchführung einer *realtime* PCR.

durch die Polymerase. Bei großer Anzahl von Schäden verringert sich somit die Produktmenge des Zielgens. Unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der UV-B-induzierten DNA-Schäden kann man daher durch die Analyse eines kleinen DNA-Abschnitts auf die Schadensmenge im gesamten Genom zurückschließen. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die DNA-Reparatur in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle durch spezifische Primer separat zu quantifizieren, ohne vorher eine Aufreinigung der Organellen oder Zellkerne durchführen zu müssen. Um auch relativ geringe Schadenshäufigkeiten detektieren zu können, wurden möglichst lange DNA-Fragmente zur Amplifikation ausgewählt.

Zur Bestimmung der DNA-Reparatur wurden *Arabidopsis* Pflanzen für 2 Wochen im Weißlicht (12 h Licht / 12 h Dunkel) auf Erde angezogen. Die Pflanzen wurden so herangezogen, dass sich ihre Blätter nicht gegenseitig beschatten konnten, um eine gleichmäßige UV-B-Bestrahlung gewährleisten zu können. Nach 2 Wochen wurden die Pflanzen für 10 min mit UV-B-Licht bestrahlt. Die Reparatur der DNA wurde den Pflanzen anschließend im Blaulicht ermöglicht. Als Referenz zur Schadens-Quantifizierung wurden jeweils zum Zeitpunkt der Bestrahlung und 24 h danach 2 Proben von Pflanzen ohne UV-B-Bestrahlung genommen. Die weiteren Proben wurden direkt nach der UV-B-Bestrahlung und dann zu fortschreitenden Zeitpunkten im photoreaktivierenden Blaulicht genommen. Es wurden jeweils 30-100 mg Pflanzenmaterial entnommen und zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus diesen Proben wurde schließlich die DNA mit dem verkürzten Protokoll zur DNA Isolation aufgereinigt (Abschnitt 2.3.10). Diese DNA wurde dann zur *realtime* PCR mit jeweils spezifischen Primern für kernkodierte DNA (GA3ox1 - 595 bp), Plastiden-DNA (psaA - 713 bp) und mitochondriale DNA (nad4 - 692 bp) eingesetzt. Aufgrund der für eine *realtime* PCR untypischen großen Fragmente, wurde die Elongationsphase von 35 s auf 65 s erhöht (Abbildung 8). Die eingesetzte DNA wurde zudem durch Fluoreszenzspektroskopie mit dem Farbstoff Hoechst 33258 quantifiziert (Abschnitt 2.3.3). Die relativen Amplifikationswerte aus der PCR wurden durch die jeweilige DNA-Menge geteilt, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Zur Quantifizierung wurden die Werte der UV-B-bestrahlten Proben (A_{UV}) durch die Werte der unbestrahlten Proben (A_0) geteilt. Somit ergab sich der Anteil der unbeschädigten bzw. reparierten DNA in den jeweiligen Proben. Durch Anwendung der Poisson-Verteilung wurde durch die Formel

$s = -\ln(A_{uv}/A_0)$ die Schadenshäufigkeit pro amplifiziertem Strang berechnet. Indem diese Häufigkeit auf die amplifizierte Fragmentlänge bezogen wurde, erhielt man die Schäden pro kb *template* DNA.

2.3.15 Klonierungstechniken

TA-Klonierung mit pGEM-T Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das Vektorsystem pGEM[®]-T von Promega verwendet. Der Vektor war an der Klonierungsstelle bereits geschnitten und enthielt an den 3' Enden jeweils einen Thymidin-Überhang. Da Taq-Polymerase bei der PCR-Reaktion in der Regel am 3' Ende Adenosin-Überhänge produziert, lässt sich das PCR-Produkt so mit hoher Effizienz in den pGEM-T Vektor ligieren. Wurde bei der PCR die *Vent*-Polymerase mit *proof reading* Funktion eingesetzt, musste zunächst eine A-Addition an den Enden des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgen, da diese Polymerase keine 3' Adenosin-Überhänge produziert. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

A-Addition	
PCR-Produkt	17 µl
10x Taq Puffer	2,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,8 µl
dATP (10 mM)	0,1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	0,7 µl

Der Ansatz wurde schließlich für 15 min bei 72 °C inkubiert.

Nach der Ligation des PCR-Produktes in den Vektor folgte die Transformation in *E. coli*. Die Klonierungsstelle von pGEM-T befindet sich im *LacZ*-Gen, welches durch die erfolgreiche Integration eines *inserts* inaktiviert wird. Daher erfolgte das *screening* von positiven Transformanten mit *insert* durch die Blau-Weiß-Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-GAL. Bei erfolgreicher Klonierung findet keine Blaufärbung der Kolonie durch aktive β -Galaktosidase statt. Zusätzlich wurden die weißen Kolonien noch durch die Ganz-Zell-PCR auf das Vorhandensein des *inserts* überprüft.

Klonierung des *CRY3*-RNAi-Vektors Zur Konstruktion eines RNAi-Systems für *CRY3* wurde der Vektor pFGC5941 (Abbildung 9A) verwendet. Dieser Vektor besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in Bakterien und ein BASTA-Resistenzgen für die Selektion in Pflanzen. Ein CaMV 35s Promotor ist für eine ausreichende Expression der *inverted repeat* Zielsequenz verantwortlich. Ein ChsA-Intron (Petunia Chalcon Synthase A) von 1352 bp stabilisiert den *inverted repeat* des Zielgenfragments. Zur Klonierung des *inverted repeat* Fragments wurden spezielle Primer benötigt, um das *CRY3*-Genfragment zu amplifizieren. Die Primer fügten den Enden des PCR-Produktes die inneren Schnittstellen *Ascl* und

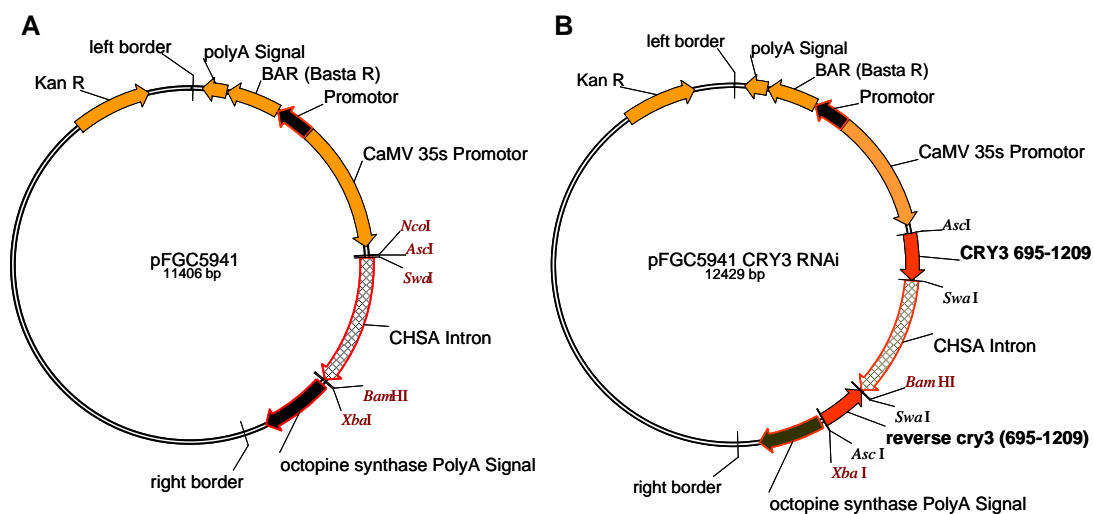


Abbildung 9: (A) Ausgangs-Vektor pFGC5941. (B) Vektor nach der Klonierung des CRY3 *inverted repeat*.

SwaI, sowie die äußeren Schnittstellen BamHI und XbaI hinzu. Der 5' Primer besaß also an seinem 5' Ende eine XbaI- und Ascl-Schnittstelle, während der 3' Primer eine BamHI- und SwaI-Schnittstelle hatte (siehe Primerliste). Der *inverted repeat* wurde über eine zwei-stufige Klonierung direkt in den binären Vektor integriert. Im ersten Schritt wurde nach der PCR-Amplifikation mit *Vent*-Polymerase das PCR-Produkt zunächst über ein Agarosegel gereinigt und anschließend nach A-Addition in den Zwischenvektor pGEM-T kloniert. Nach einer Plasmidpräparation wurde das CRY3-Fragment in pGEM-T an den inneren Schnittstellen mit Ascl und SwaI geschnitten und über Gelelektrophorese vom restlichen Vektor getrennt. Das erhaltene Fragment wurde in den ebenfalls mit diesen Enzymen behandelten binären Vektor pFGC5941 ligiert und in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Im zweiten Schritt wurde dieser binäre Vektor mit dem ersten CRY3 *insert* als Zielvektor verwendet und mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI behandelt. Das zweite CRY3 *insert* stammt wieder aus dem Zwischenvektor pGEM-T mit CRY3, wobei dieser Vektor ebenfalls mit BamHI und XbaI geschnitten wurde und das CRY3-Fragment über eine Gelaufreinigung vom Vektor pGEM-T getrennt wurde. Durch Ligation dieses *inserts* mit dem Zielvektor pFGC5941 entstand schließlich der *inverted repeat* des Zielgens CRY3 (Abbildung 9B). Nachdem der binäre Vektor dann zunächst in *E. coli* transformiert worden war und durch Testverdaus überprüft worden war, erfolgte die Übertragung des Vektors in *Agrobacterium tumefaciens* durch direkten DNA-Transfer.

Klonierung des CRY3-Überexpressionsvektors Als binärer Vektor für die Überexpression von Cryptochrom 3 wurde ebenfalls der Vektor pFGC5941 (Abbildung 9A) verwendet, wobei jedoch das vorhandene CHSA-Intron entfernt worden war. Zum Einfügen einer NcoI- und einer BamHI-Schnittstelle wurde CRY3 inklusive der Signalsequenz (aa 1-569) zunächst mit den entsprechenden Primern unter Verwendung von *Vent*-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und mit dem *Qiaex II Kit* von Qiagen wieder

aus dem Gel isoliert. Vor der Ligation des PCR-Produktes in den Zwischenvektor pGEM-T erfolgte eine A-Addition mit Taq-Polymerase. Kompetente *E. coli* XL10-Gold Zellen wurden dann mit dem Ligationsansatz transformiert und schließlich zur Blau-Weiß Selektion auf LB-Platten ausplattiert. Nach der Selektion wurden die positiven Kolonien nochmals durch eine Kolonie-PCR überprüft. Aus einer Übernachtskultur der positiven Kolonien wurde dann durch eine Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert. Das *CRY3 insert* wurde an dieser Stelle sequenziert, um mögliche Fehler bei der vorangegangenen Amplifikation durch die PCR auszuschließen. Die Plasmid-DNA wurde dann mit NcoI und BamHI geschnitten, um das *CRY3 insert* über eine Gelelektrophorese vom restlichen Vektor zu trennen.

Vor der Ligation wurde der Zielvektor pFGC5941 ebenfalls mit BamHI und NcoI geschnitten und das CHSA-Intron wurde über eine Gelaufreinigung vom Vektor getrennt. Das *CRY3 insert* wurde schließlich mit dem geschnittenen Vektor pFGC5941 ligiert und der Ligationsansatz dann in kompetente XL10-Gold-Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR mit *CRY3*-spezifischen Primern auf positive Transformanten getestet. Des Weiteren wurde das *CRY3*-Überexpressionskonstrukt durch verschiedene Test-Verdaus überprüft und bestätigt. Der binäre Vektor wurde letztlich durch eine Minipräparation aus *E. coli* isoliert und über einen direkten DNA-Transfer in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert.

2.3.16 Direkter DNA-Transfer in *Agrobacterium tumefaciens*

Der in *E. coli* klonierte binäre T-DNA Vektor pFGC5941 (Abbildung 9 A) wurde ohne Konjugation über einen direkten Transfer der Plasmid-DNA in den *Agrobacterium* Stamm GV3101::pMP90 gebracht. Dieser *Agrobacterium* Stamm besitzt ein chromosomales Rifampicin-Resistenzgen und ein Gentamycin-Resistenzgen, welches auf dem Ti-Plasmid kodiert ist.

Zunächst wurde der Stamm GV3101::pMP90 auf einer LB-Platte mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Rifampicin und 15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Gentamycin ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert. Eine 3 ml LB-Vorkultur mit Rifampicin (50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und Gentamycin (15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) wurde dann mit einer Einzelkolonie von der Agar-Platte inokuliert und bei 28 °C für 24 h geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium mit Rifampicin und Gentamycin angeimpft und bei 28 °C und ca. 250 rpm etwa 4-5 h schüttelnd inkubiert bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5-1 erreicht hatte. Die Zellen wurden zunächst auf Eis gekühlt und dann in einem autoklavierten 250 ml Zentrifugenbecher für 5 min bei 3000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde schließlich in 1 ml kalter 20 mM CaCl₂ -Lösung resuspendiert und in 100 µl Aliquots auf Eis in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Nach der Zugabe von 1 µg der zu transformierenden DNA, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen dann für 5 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Eine weitere Inkubation für 2-4 h bei 28 °C unter leichtem Schütteln erfolgte, nachdem 1 ml vorgewärmtes (28 °C) LB-Medium zugegeben worden war. Letztendlich wurden die Zellen noch einmal ankonzentriert, indem sie für 30s abzentrifugiert wurden und 1 ml Überstand abgenommen wurde. Die Zellen wurden in den verbliebenen 100 µl Flüss-

sigkeit vorsichtig resuspendiert und dann auf einer YEB-Platte mit 25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Kanamycin, 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Rifampicin und 15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Gentamycin ausplattiert und für 3 Tage bei 28°C inkubiert.

Die erhaltenen Kolonien wurden über eine Kolonie-PCR mit ganzen Zellen auf eine erfolgreiche Transformation getestet, bevor sie weiterverwendet wurden. 3 ml YEB-Medium mit Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin wurden dann mit einer positiv getesteten Kolonie inokuliert und für 2 Tage bei 28°C schüttelnd inkubiert. Zum Anlegen einer Dauerkultur dieser transformierten Stämme wurden 500 μl der 3 ml Kultur mit 500 μl 50% Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert.

2.3.17 *Floral dip* Methode zur *Agrobakterien*-vermittelten Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Floral dip (Clough und Bent, 1998) ist eine einfache Methode zur Herstellung von transgenen *Arabidopsis* Linien. Diese Methode kommt ohne eine Regeneration von transformierten Zellen oder Verwendung von Vakuum-Infiltration aus.

Die zu transformierenden *Arabidopsis* Linien wurden zunächst in Töpfen mit Erde angezogen. Pro Topf sollten 3-5 Pflanzen vorhanden sein. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtag-Bedingungen mit 16 h Licht und 8 h Dunkel. Die Erträge der Pflanzen können jedoch erhöht werden, indem die Pflanzen die ersten 4 Wochen unter Kurztagbedingungen gehalten werden und erst zur Blühinduktion in den Langtag überführt werden. Um den Ertrag weiter zu erhöhen, wurden die ersten Blütenknospen entfernt, so dass sich mehrere sekundäre Infloreszenzen bildeten. Die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte, nachdem die sekundären Infloreszenzen eine Länge von 2-10 cm erreicht hatten, aber die Blütenknospen noch nicht geöffnet waren. Eventuell vorhandene offene Blüten wurden zuvor entfernt.

Zur Infiltration wurde der *Agrobacterium* Stamm GV3101::pMP90 mit dem entsprechenden T-DNA-Vektor verwendet. 5 ml LB-Medium mit 25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Kanamycin, 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Rifampicin und 15 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Gentamycin wurden dazu mit einer Einzelkolonie dieses Stammes beimpft und bei 250 rpm schüttelnd für 24 h bei 28°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 500 ml LB-Medium mit Antibiotika inokuliert und unter den gleichen Bedingungen für mindestens 24 h geschüttelt. Die Kultur sollte nach dieser Zeit etwa eine OD_{600} von 2 besitzen. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 5500 g bei Raumtemperatur wurde das Pellet in Inokulationsmedium (5% Saccharose; 0,05% Silwet L-77) resuspendiert. Die Menge des Inokulationsmediums wurde so berechnet, dass die Bakterienkultur schließlich eine OD_{600} von 0,8 besaß. Für den *floral dip* wurde die Bakterien-Suspension in geeignete Bechergläser überführt. Die Pflanzen wurden dann kopfüber für ca. 5 Sekunden in die Suspension getaucht, so dass sich alle oberirdischen Teile der Pflanzen in der Flüssigkeit befanden. Damit die Pflanzen dabei nicht aus den Töpfen fielen, wurden sie mit einem weitmaschigen Drahtgitter abgedeckt. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen schließlich in einer Kiste mit Frischhaltefolie abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Nach 1-2 Tagen bei geringer Lichtintensität wurde die Folie

entfernt und die Pflanzen wurden bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen gehalten.

2.3.18 Selektion von homozygoten transgenen *Arabidopsis* Linien mit Einzelinsertion

Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurden die Samen der transformierten Pflanzen zunächst mit BASTA behandelt. Der verwendete Vektor pFGC5941 vermittelt eine BASTA-Resistenz, so dass transgene Pflanzen gegenüber diesem Herbizid unempfindlich sind. Die T₁-Generation wurde dazu auf Erde ausgesät und nach Entfaltung der Kotyledonen 3x im Abstand von 2 Tagen mit BASTA besprüht. Die BASTA-Lösung hatte eine Endkonzentration von 240 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Nach etwa 2 Wochen verfärbten sich nicht resistente Keimlinge und starben schließlich ab.

Um homozygote transgene *Arabidopsis* Linien mit einer Einzelinsertion zu erhalten, wurde zunächst eine Segregationsanalyse durchgeführt. Dazu wurde die T₂-Generation der transgenen Linien mit BASTA selektiert. Pflanzenlinien, bei denen ca. $\frac{1}{4}$ der Pflanzen sensitiv auf BASTA reagierten, wurden durch Anwendung der *realtime* PCR weiter analysiert. Dazu wurde aus Blättern der *Arabidopsis* Pflanzen genomische DNA isoliert und mit pFGC5941- bzw. *CRY3*-spezifischen Primern die relative DNA-Menge dieser Sequenzen bestimmt. Bei Analyse einzelner Pflanzen der T₃-Generation durch diese Methode erhält man bei homozygoten Pflanzen im Vergleich zu heterozygoten Pflanzen die doppelte Menge an pFGC5941-DNA.

2.3.19 Screening der Koncz T-DNA-Kollektion

Die T-DNA-Kollektion von Dr. Csaba Koncz wurde mit einem Protokoll von Gabino Rios, Britta Hertel und Sabine Schäfer nach einer Insertionslinie im *CRY3*-Gen gescreent. Das *screening* erfolgte am Max Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln. Die Kollektion enthält 92500 unabhängige transgene Linien mit einer durchschnittlichen Zahl von 1,3 Insertionen pro Linie. Das *screening* erfolgte durch eine PCR-basierte Methode, bei der 2 T-DNA-spezifische und 2 *CRY3*-spezifische Primer verwendet wurden. Die DNA der einzelnen Insertionslinien war in 2 Ebenen in verschiedenen DNA-Pools zusammengefasst. Zunächst war die DNA in 900 unterschiedlichen Pools von jeweils 100 Einzelpflanzen kombiniert. Diese 100er Pools waren wiederum zu 40 Pools von jeweils 4000 bzw. 6000 Pflanzen zusammengefasst. Diese großen Pools waren in Reihen von 1 bis 20 und in Spalten von A bis T durchnummeriert (Tabelle im Anhang). Jeder 100er Pool kam einmal in der Zahlenreihe und einmal in den Buchstaben-spalten vor, so dass mit dem PCR *screening* von 40 großen Pools eine mögliche Insertion auf 4 bzw. 6 kleine Pools eingegrenzt werden konnte. Welcher dieser 4 bzw. 6 Pools (100er) die entsprechende Insertion enthielt, wurde in einer zweiten *screening* Runde bestimmt. Die entsprechende Einzelpflanze mit der *CRY3*-Insertion wurde schließlich in einem dritten *screening* gefunden, bei dem die DNA der 100 Einzelpflanzen zu 20 Pools von jeweils 10 Pflanzen zusammengefasst war (1-10 und A-J). Aus der Kombination der positiv getesteten Pools wur-

de die Einzelpflanze identifiziert.

Für das PCR *screening* wurden folgende Primer verwendet:

T-DNA-Primer

LB primer (FISH1) 5' - CTG GGA ATG GCG AAA TCA AGG CAT C - 3'

RB primer (FISH2) 5' - CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC A - 3'

CRY3-Primer

CRY3 (upstream) 5' - TGT TTT GCG GTT GGG TTG GAT ACG AA - 3'

CRY3 (downstream) 5' - TTG GGA AGT GAG AAT CGC TAA GTG GG - 3'

Der *CRY3 upstream* Primer lag 1138 bp vor dem *CRY3* Startcodon, der *downstream* Primer war 797 bp nach dem Stopcodon positioniert. Beide Primer amplifizierten die DNA in Richtung der kodierenden *CRY3*-Region. Für jeden DNA-Pool wurden somit 4 PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen durchgeführt:

P1 = LB-Primer (FISH1) + *CRY3 (upstream)*

P2 = RB-Primer (FISH2) + *CRY3 (upstream)*

P3 = LB-Primer (FISH1) + *CRY3 (downstream)*

P4 = RB-Primer (FISH2) + *CRY3 (downstream)*

Für die PCR wurde LA-Tak-Polymerase von Takara verwendet, um auch große Fragmente amplifizieren zu können. Die insgesamt 160 PCR Reaktionen der ersten *screening* Runde wurden in zwei 96-Loch-Platten angesetzt und nach der Amplifikation auf einem Agarosegel aufgetrennt. Eine Bande, die bei der PCR mit der gleichen Primer-Kombination einmal in der Zahlenreihe und einmal in der Buchstabenreihe auftrat, deutete auf eine Insertion im gewünschten Gen hin.

In der zweiten *screening* Runde wurde ebenfalls durch PCR aus den 4 bzw. 6 kleinen Pools (100er) derjenige mit der passenden Insertion gefunden. Die genaue Identität der Mutation wurde anschließend noch durch Sequenzierung der Insertionstelle bestimmt. Somit musste schließlich noch aus dem passenden 100er Pool die richtige Einzelpflanze identifiziert werden.

Zur Isolation der individuellen Mutante aus dem Pool wurden zunächst die Samen von den gelagerten transformierten Mutterpflanzen mit einem Sieb von restlichem Pflanzenmaterial abgetrennt. Die Samen wurden mit 5% Hypochlorit oberflächensterilisiert und schließlich auf MS-Platten mit Hygromycin zur Selektion ausgesät. Die Pflanzen wurden zur Extraktion von DNA für 2-3 Wochen in einer Klimakammer angezogen. Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem DNA-Isolationsprotokoll mit CTAB (Abschnitt 2.3.10). Bei der DNA-Isolation wurden die Keimlinge zu Pools von jeweils 10 Einzel-Linien zusammengefasst, so dass man durch eine weitere zweidimensionale Anordnung die passende Pflanze mit nur 20 PCR-Reaktionen ermitteln konnte (Schema im Anhang).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinextraktion aus Keimlingen

Für Proteinextrakte aus *Arabidopsis* Keimlingen wurden die Keimlinge für 5-7 Tage auf Erde angezogen. Etwa 1 g der oberirdischen Teile der Pflanzen wurden mit einer feinen Schere geerntet und dann sofort in flüssigem N₂ eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Für den Zellaufbruch wurde eine Schwingbechermühle vom Typ Retsch MM 200 mit Stahlbechern (34 mm Ø) und 2 Stahlkugeln (12 mm Ø) verwendet. Die Stahlbecher und die Kugeln wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und das tiefgefrorene Pflanzenmaterial zugegeben. Auf 1 g Pflanzenmaterial wurden 450 µl kalter Aufbruchpuffer pipettiert. Der Zellaufbruch erfolgte für 5 Minuten bei 30 Hz. Anschließend wurde das Pulver mit einem vorgekühlten Spatel in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem der Extrakt aufgetaut war, wurde eine entsprechende Menge an 5x konzentriertem SDS-Probenpuffer zugegeben und gut gemischt. Der Extrakt wurde dann für 10 min bei 97 °C aufgekocht und anschließend für 25 min bei 16 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Puffer und Reagenzien	
Aufbruchpuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM DTT; Proteaseinhibitor cocktail, Complete Mini, EDTA-free (Roche, Mannheim)
5x SDS-Probenpuffer	0,225 M Tris/HCl pH 6,8; 50% Glycerin; 5% SDS; 0,05% Bromphenolblau; 0,25 M DTT

2.4.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Für die Proteinbestimmung von Proben in SDS-Probenpuffer wurde die Amidoschwarzmethode verwendet, da diese Methode im Gegensatz zum Bradford assay nicht von SDS beeinflusst wird.

5 µl der zu bestimmenden Probe in 195 µl Wasser wurden mit 800 µl der Amidoschwarzlösung gut gemischt (Vortexer). Nach 12 min Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde der Überstand abgeschüttet. Bei proteinhaltigen Proben war ein blaues Präzipitat an der Gefäßwand sichtbar. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurde noch einmal gewaschen. Dazu wurde 1 ml der Waschlösung zugeben und nach kräftigem Mischen nochmals für 12 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Waschlösung entfernt war, wurde das Präzipitat getrocknet und anschließend wieder in 1 ml 0,2 M NaOH-Lösung aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch durch Absorption bei 615 nm gegen eine Blindprobe ohne Protein bestimmt. Für jede neue Amidoschwarzlösung wurde eine Eichkurve mit BSA-Standards erstellt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte immer als Dreifachbestimmung.

Lösungen zur Proteinbestimmung	
Amidoschwarzlösung	90% Methanol; 10% Essigsäure; Spatelspitze Amidoschwarz 10B (Roth) bis zu einer OD ₆₁₅ =10
Waschlösung	90% Methanol; 10% Essigsäure

2.4.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen anhand ihrer Größe. Die Proteine werden zuvor in SDS denaturiert und es bilden sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Da auf diese Weise alle Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine aufgehoben werden, unterscheiden sich die verschiedenen Proteine nur noch aufgrund ihrer Größe und werden im Gel ihrer molekularen Masse entsprechend aufgetrennt.

Um Proteingestamtextakte zu analysieren, wurde das SDS-PAGE-System nach Laemmli (1970) eingesetzt. Lämmli-Gele verwenden bei Trenn- und Sammelgel jeweils Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert, um die Banden an der Trenngelgrenze zusammenzuschieben und so eine hohe Trennschärfe zu erreichen. Das Trenngel hatte eine Größe von 18,2 x 14 x 0,1 cm, das Sammelgel war 18,2 x 4 x 0,1 cm groß. Es wurden Kämme mit 10 oder 15 Taschen verwendet, wobei jede Tasche maximal 200 µl Probenvolumen fasste. Die Glasplatten wurden vor dem Fertigstellen des Gels gründlich mit SDS gewaschen. Zum Abdichten des Systems wurde zunächst 1 ml Trenngel mit 16 µl APS und 2,4 µl TEMED verwendet. Zusätzlich wurden die Spacer zwischen den Platten von außen mit 2%iger Agaroselösung abgedichtet. APS und TEMED wurden als Polymerisationsstarter erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben. Zum Glätten des Trenngels wurde es mit 50%igem Isopropanol überschichtet, welches nach der Polymerisation des Gels wieder entfernt wurde. Die Gele wurden in der Regel mit 100 µg Gesamtprotein pro Tasche beladen. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min bei 95°C in SDS-Probenpuffer aufgekocht. Als Markerproteine wurden 10 µl von SDS 7B Marker (Sigma) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 45 mA konstanter Stromstärke für ca. 4-5 h bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreichte.

Lämmli Gel	
Trenngel 10%	10% Acrylamid; 0,265% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS
Sammelgel 5%	5% Acrylamid; 0,13% Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,2% SDS
Elektrophoresepuffer	3,028 g Tris; 14,4 g Glycin; 1 g SDS; auf 1 Liter auffüllen mit A. bidest. (pH nicht einstellen)

Die Lösungen für die Gele wurden nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
20% Acrylamid + 0,53% Bisacrylamid	20 ml	3,325 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	10 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	3,325 ml
A.bidest.	10 ml	6,510 ml
10% SDS	400 µl	265,7 µl
10% APS	160 µl	99,6 µl
TEMED	24 µl	6,65 µl

2.4.4 Färbung von Acrylamidgelen mit Coomassie

Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst 10 min in A. dest. gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 2 h, in Färbelösung schüttelnd, angefärbt. Das Gel wurde dann über Nacht in 10%iger Essigsäure geschwenkt, so dass die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Vor dem Trocknen des Gels wurde nochmals in A. dest. gewaschen. Das Gel wurde dann in einen Rahmen zwischen 2 Lagen angefeuchtete Zellophanfolie eingespannt und über Nacht getrocknet.

Färbelösung	25% Isopropanol; 10% Essigsäure; 0,05% Coomassie-R250
Entfärber	10% Essigsäure

2.4.5 Western Transfer auf Nitrocellulosemembranen (Semi Dry Blot)

Um die im Gel aufgetrennten Proteine weiter analysieren zu können, wurden sie elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (porablot NCP, Macherey-Nagel) übertragen und somit einer Inkubation mit Antikörpern frei zugänglich gemacht.

Vor dem Blotten wurde das SDS-Gel für 30 min in Transferpuffer geschwenkt. Währenddessen wurden 12 Lagen *blotting* Papier (MN 218 B, Macherey-Nagel) in der Größe des Gels vorbereitet und in Transferpuffer getränkt. Auch die Nitrocellulosemembran wurde für 5 min in Transferpuffer geschwenkt. Im Gegensatz zu PVDF-Membranen muss Nitrocellulose nicht in Methanol aktiviert werden. Auf einer Glasplatte wurden 6 Lagen des eingeweichten *blotting* Papiers mit einem Reagenzglas ausgerollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen. Da sich bei der verwendeten Transblot-Apparatur (Biorad) die Anode unten befindet, wurde zunächst die Membran und dann das Polyacrylamidgel auf dem *blotting* Papierstapel positioniert. Das Gel wurde mit weiteren 6 Lagen eingeweichtem *blotting* Papier bedeckt und die Luftblasen nochmals ausgerollt. Dieser Stapel wurde in die Blot-Apparatur übertragen und die Proteine wurden bei 21 V konstanter Spannung aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die Transferdauer betrug bei großen analytischen Gelen 120 min und bei den Minigelen 60 min.

Puffer	
Bjerrum, Schäfer und Nielsen Transferpuffer (BSN)	48 mM Tris/HCl; 39 mM Glycin; 0,0375% SDS; 20% Methanol; pH 9,2 Einwaage: 5,82 g Tris; 2,93 g Glycin; 3,75 ml 10% SDS; 200 ml Methanol; mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen; pH wird durch exaktes Einwiegen erhalten

2.4.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Inkubation der Nitrocellulose-Membran mit Antikörpern Nach dem Transfer wurde die Membran 60 min bei RT in Blockpuffer geschwenkt oder alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert, um die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran abzublocken. Das restliche Milchpulver wurde dann durch Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper unter langsamem Schwenken. Die Antikörper wurden entsprechend den Angaben in Kapitel 2.1.4 in TBS-T verdünnt. Diese Antikörperlösungen wurden teilweise mehrmals verwendet und enthielten daher zur längeren Lagerung 0,02% Na-Azid. Nachdem die Membran 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen war, um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 1 h mit sekundärem Antikörper (1:10 000 Verdünnung in TBS-T) schüttelnd inkubiert. Je nach der verwendeten Nachweismethode wurden Antikörper verwendet, die entweder mit *horseradish peroxidase* (HRP) für ECL-Detektion oder alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Anschließend musste die Membran nochmals 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen werden.

Puffer und Lösungen	
TBS-T Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20
Blockpuffer	7% Milchpulver (Bio-Magermilchpulver, Heirler Cenovis GmbH) in TBS-T

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Detektion Für die ECL-Detektion war die Nitrocellulosemembran zuvor mit einem primären Antikörper und dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert worden. Vor der Detektion wurde die Membran für etwa 5 min in 0,5 M Tris/HCl pH 7,5 geschwenkt. Die Detektionslösungen A und B wurden dann zusammengegeben und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. In dieser Detektionslösung wurde die Membran 1 min geschwenkt und dann luftblasenfrei in einer Klarsichtfolie (Plastibrand Entsorgungsbeutel, Brand) eingeschweißt. Im roten Sicherheitslicht wurde ein entsprechend großes Stück Hyperfilm™ ECL über der Membran positioniert. Der Film wurde abhängig von der Signalstärke unterschiedlich lange (10 s bis 15 min) in einer Hypercassette™ (Amersham Pharmacia Bioscience) exponiert. Anschließend wurde der Film mit Kodak GBX-Entwicklerlösung entwickelt und, nach einem Waschschrift in mit Essigsäure angesäuertem Wasser, mit Kodak GBX-Fixierlösung fixiert.

Detektionslösung	
Lösung A	5 mM Luminol; 0,8 mM p-Cumarsäure; 0,2 M Tris/HCl pH 8,45 Pipettierschema: 300 µl Luminol (250 mM in DMSO); 133,5 µl p-Cumarsäure (90 mM in DMSO); 1 ml Tris/HCl pH 8,45 (3 M); mit A. dest. auf 15 ml auffüllen
Lösung B	0,018% H ₂ O ₂ in A. dest. Pipettierschema: 9,15 µl H ₂ O ₂ (30%) auf 15 ml A. dest.

Strippen der Nitrocellulose-Membran und Inkubation mit neuen Antikörpern Mit dieser Methode wurden nach einer erfolgten ECL-Detektion die gebundenen Antikörper wieder von der Membran entfernt, um den Nachweis mit anderen Antikörpern zu ermöglichen. Die auf die Membran geblotteten Proteine blieben bei dieser Behandlung erhalten. Diese Methode konnte mit derselben Membran mehrmals durchgeführt werden.

Zunächst wurde die Membran bei 60 °C in vorgewärmtem *stripping* Puffer für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min bei RT in TBS-T gewaschen. Vor der Inkubation mit einem neuen primären Antikörper musste die Membran nochmals für 1 h bei RT in 7% Trockenmilch in TBS-T geblockt werden.

Stripping Puffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2% SDS
-------------------------	------------------------------------------------------------------

2.4.7 Isolation von Organellen

Protoplastierung von *Arabidopsis* Zellkultur Die protoplastierten *Arabidopsis* Zellen wurden zur Isolation von Chloroplasten verwendet. Dazu wurden als Ausgangsmaterial 4 Kolben mit je 50 ml 4 Tage alter grüner Zellkultur (Ler) eingesetzt. Die Zellen wurden in sterilen 50 ml Falcon Röhrchen gesammelt und 5 min bei 95 g pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die Zellen in 35 ml Enzymlösung resuspendiert. Die Zellsuspension eines Röhrchens wurde dann auf jeweils zwei Petrischalen verteilt und die Schalen wurden mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln schüttelnd bei 22 °C und 60 rpm. Am folgenden Tag wurden die Protoplasten aus 2 Petrischalen mit einer abgeschnittenen 5 ml Spitze wieder in je ein Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 95 g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in je 20 ml W5-Lösung resuspendiert. Die Protoplasten wurden nochmals bei 95 g abzentrifugiert und anschließend in 15 ml W5 resuspendiert. Zur Kontrolle der Protoplastierung wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. Die Protoplasten wurden auf Eis gelagert und direkt zur Isolation der Chloroplasten weiterverwendet.

Puffer und Lösungen	
Enzymlösung	1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Serva); 0,25% (w/v) Macerozym R-10 (Serva), in 8 mM CaCl ₂ , 0,4 M Mannitol, pH 5,5-5,8 (KOH); sterilfiltriert
W5-Lösung	150 mM NaCl; 125 mM CaCl ₂ ; 5 mM KCl; 5 mM Glucose, pH 5,8 (KOH), sterilfiltriert

Isolation von Chloroplasten aus *Arabidopsis* Protoplasten (Abgewandelt nach Kunst, 1998)

Vor Beginn der Chloroplastenisolation wurden die Percollgradienten zur weiteren Aufreinigung vorbereitet. Dazu wurden je 3,5 ml 80%ige Percoll-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit einer 10 ml Glaspipette wurden 9,5 ml 40%ige Percoll-Lösung vorsichtig darübergeschichtet, ohne die beiden Lösungen zu vermischen. Die Gradienten wurden bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Die Protoplasten aus ursprünglich 200 ml Zellkultur wurden in vier 50 ml Falcon Röhrchen 5 min bei 95 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen wurden zum Aufbrechen in je 10 ml kaltem Protoplasten-Lysis-Puffer resuspendiert. Zum mechanischen Aufbruch der empfindlichen Protoplasten wurden die Zellen zusätzlich mit einer aufgeschnittenen 5 ml Spritze durch ein 10 µm Nylonnetz gepresst. Das Filtrat wurde in zwei Falcons auf Eis aufgefangen. Zum Pelletieren der Chloroplasten wurde das Filtrat für 5 min bei 2500 g und 4°C zentrifugiert. Das Chloroplastenpellet wurde dann in je 2,8 ml kaltem RP mit einem feinem Pinsel resuspendiert. Der Chloroplastenrohextrakt wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette auf die beiden vorbereiteten Percoll-Gradienten aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation mit einem *swing-out* Rotor vom Typ TST 28 für 8 min bei 10 000 rpm und 4°C. Aufgrund ihrer spezifischen Dichte bildeten die intakten Plastiden eine grüne Bande an der Grenze zwischen der 80%igen und der

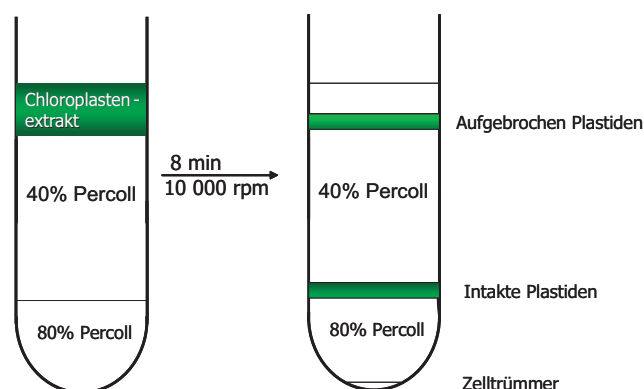


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Percoll-Stufengradienten vor und nach der Zentrifugation. Die intakten Plastiden sammeln sich an der 80% - 40% Grenze.

40%igen Percoll-Lösung. Die aufgebrochenen Plastiden und Thylakoidmembranen lagen dagegen der 40%igen Lösung auf. Die beiden grünen Banden wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Zum Entfernen des Percolls wurde den Chloroplastensuspensionen jeweils 30 ml kalter RP zugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet in je 5 ml RP resuspendiert. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle der Chloroplastensuspensionen. Die Chloroplasten wurden dann nochmals für 5 min bei 2500 g zentrifugiert, in 2 ml Aufbruchpuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufbruch wurde den Chloroplasten eine entsprechende Menge an 5x SDS-Probenpuffer zugegeben und die Suspension wurde 10 min bei 97 °C unter gelegentlichem Schütteln aufgeköcht. Der Chloroplastenproteinextrakt wurde schließlich durch 15-minütige Zentrifugation bei 16 000 g aus dem Überstand gewonnen.

Puffer und Lösungen			
Protoplasten (PLP)	Lysis	Puffer	0,3 M Sorbitol; 20 mM Tricin pH 8,4 (KOH); 10 mM EDTA; 10 mM NaHCO ₃ ; 0,1% BSA
Resuspendierungspuffer (RP)			0,3 M Sorbitol; 20 mM Tricin KOH, pH 7,6; 5 mM MgCl ₂ ; 2,5 mM EDTA
Percoll	Gradienten-Lösung (für 2 Gradienten)		80% Percoll: 5,6 ml Percoll (Sigma); 1,4 ml 5x konzentrierter RP 40% Percoll: 8 ml Percoll; 10 ml 2x konzentrierter RP; 2 ml H ₂ O
Aufbruchpuffer			100 mM Tris/HCl 7,5; 50 mM NaCl; 5mM DTT

Isolation von Mitochondrien aus *Arabidopsis* Zellkultur (Abgewandelt nach Klein et al., 1998)

Alle Schritte zur Isolation der Mitochondrien wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4-7 °C durchgeführt. Es wurden vier 50 ml Kolben mit 8 Tage alter heterotropher *Arabidopsis* Zellkultur als Ausgangsmaterial verwendet. Die Zellen wurden in 4 sterile Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 150 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Zellpellet wurde in jeweils 50 ml kaltem mEP resuspendiert. Im Gegensatz zu den empfindlicheren Chloroplasten konnte zum Zellaufschluss für die Mitochondrienisolation ein Mixer mit auswechselbaren Rasierklingen verwendet werden. Der Mixer war zuvor im Kühlraum vorgekühlt worden. Alle Zellsuspensionen, insgesamt 200 ml, wurden zusammen im Mixer für 2x 5s und 1x 10s homogenisiert. Zwischen den einzelnen Mixerstößen lagen etwa 30 s, so dass sich die Zellen wieder absetzen konnten. Das Zellhomogenisat wurde anschließend durch eine Lage 100 µm Nylonnetz und 1 Lage Miracloth (Calbiochem) filtriert und in einem Kolben auf Eis aufgefangen. Das Filtrat wurde dann auf zwei 250 ml Zentrifugenbecher verteilt und

für 5 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert (JA-14, Beckmann J2-21). Der Überstand wurde nochmals für 5 min bei 6000 g, 4°C zentrifugiert. Durch erneute Zentrifugation des Überstandes für 10 min bei 16 000 g, 4°C wurden die Mitochondrien pelletiert. Das Pellet wurde dann in jeweils 1,5 ml mWP mit einem feinen Pinsel resuspendiert. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle des Mitochondrienrohextraktes. Während die Gradienten zur weiteren Aufreinigung vorbereitet wurden, lagerten die Mitochondrien auf Eis. Um bei der Gradientenzentrifugation nicht zu viel Material zu verlieren, wurde nur ein Gradient vorbereitet. Dazu wurden in einem Zentrifugenröhrchen 10 ml der 23%igen Percoll-Lösung vorsichtig mit einer Glaspipette über 5 ml der 40%igen Lösung geschichtet, so dass sich die Lösungen nicht vermischten. Auf die 23%ige Lösung wurden wiederum 10 ml der 18%igen Percoll-Lösung pipettiert. Der Mitochondrienrohextrakt (3 ml) wurde dann mit einer Pasteurpipette über den Gradienten geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation mit einem *swing-out* Rotor des Typs TST 28 für 45 min bei 12 000 g und 4°C. Die bräunliche Bande an der Phasengrenze zwischen der 40%igen und der 23%igen Percoll-Lösung wurde daraufhin vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein 35 ml Zentrifugengefäß überführt. Um das Percoll zu entfernen, wurden dem Mitochondrienextrakt 20 ml mRP zugegeben und zum Pelletieren der Mitochondrien wurde für 10 min bei 16 000 g und 4°C (JA-20 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet nochmals in mRP resuspendiert und für 10 min bei 16 000 g abzentrifugiert. Das erhaltene Mitochondrienpellet wurde schließlich in 1,4 ml mRP resuspendiert. Es folgte eine weitere mikroskopische Kontrolle, um den Erfolg der Aufreinigung abzuschätzen. Die Mitochondriensuspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 16 000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 µl Aufbruchpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl 5x SDS-Probenpuffer wurde der Extrakt für 15 min bei 97°C unter gelegentlichem Schütteln aufgeköcht. Der Mitochondrienproteinextrakt wurde schließlich durch 15-minütige Zentrifugation bei 16 000 g aus dem Überstand gewonnen.

Puffer und Lösungen	
Mitochondrien- Extraktions- puffer (mEP)	450 mM Saccharose; 15 mM Mops; 2,5 mM EDTA; 2 g/l BSA; 6 g/l Polyvinylpyrrolidon (PVP); pH 7,4 mit KOH einstellen
Mitochondrien-Waschpuffer (mWP)	300 mM Saccharose; 10 mM Mops; 1mM EDTA; 1g/l BSA; pH 7,2 mit KOH einstellen
Resuspendierungspuffer (mRP)	400 mM Mannitol; 10 mM Tricin-KOH pH 7,2; 1 mM EDTA; mit KOH auf pH 7,2 einstellen
Gradientenpuffer (5xGP)	1,5 M Saccharose; 50 mM Mops; mit KOH auf pH 7,2 einstellen
Percoll Gradienten-Lösung (für 1 Gradienten)	40% Percoll: 2 ml 5x Gradientenpuffer; 4 ml Percoll; 4 ml A. bidest. 23% Percoll: 2 ml 5xGP; 2,33 ml Percoll; 5,67 ml A. bidest. 18% Percoll: 2 ml 5xGP; 1,83 ml Percoll; 6,17 ml A. bidest.
Aufbruchpuffer	100 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM DTT

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation von Cryptochrom 3

Die Lokalisation von Cryptochrom 3 in Chloroplasten und Mitochondrien wurde bereits von Kleine et al. (2003) durch die Analyse von GFP-Fusionsproteinen und durch *in vitro* Importstudien an isolierten Chloroplasten gezeigt. Diese Ergebnisse wurden in weiteren Untersuchungen durch den immunologischen Nachweis von cry3 in isolierten Organellenpräparationen bestätigt (Meier, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines neuen cry3-Antikörpers ergänzt (Abbildung 11 B). Zunächst waren für diese Lokalisationsstudie die Organellen aus *Arabidopsis thaliana* isoliert worden. Aufgrund der großen Menge an benötigtem Pflanzenmaterial war dazu *Arabidopsis* Zellkultur verwendet worden. Zur Isolation der Chloroplasten diente eine grüne autotroph angezogene Zellkultur, während die Mitochondrien aus weißer heterotropher Kultur gewonnen wurden. Die Chloroplastenfraktion wurde durch differentielle Zentrifugation sowie einen Percoll-Stufengradienten aufgereinigt. Dadurch konnten intakte Plastiden von aufgebrochenen Plastiden getrennt werden. Die Isolation der Mitochondrien erfolgte ebenfalls zunächst durch differentielle Zentrifugation. Ein zweiter Mitochondrienextrakt wurde zusätzlich durch einen Percoll-Stufengradienten aufgereinigt, so dass die Mitochondrien in dieser Fraktion noch stärker angereichert werden konnten. Jeweils 100 µg Gesamtprotein der Organellenfraktion sowie der dazugehörigen Gesamtproteinextrakte wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Neben cry3 wurden DnaK und CAB (Chlorophyll a/b bindendes Protein) als mitochondriale bzw. plastidäre Markerproteine immunologisch nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 A-D gezeigt. Eine erfolgreiche Anreicherung der Mitochondrien konnte durch die Verwendung eines Antikörpers gegen das mitochondriale Protein DnaK belegt werden (Abbildung 11 C). Das Signal ist in den Mitochondrienfraktionen deutlich stärker als im Gesamtextrakt. Der Nachweis des CAB-Proteins belegt die deutliche Anreicherung der plastidären Proteine in der Chloroplastenfraktion (Abbildung 11 D). Zusätzlich zum Nachweis mit dem affinitätsgereinigten cry3 AK #503 in Abbildung 11 A wurde ein zweiter unabhängig hergestellter Antikörper gegen cry3 (SA 4288, Abbildung 11 B) verwendet. Mit beiden Antikörpern konnte Cryptochrom 3 sowohl in der Chloroplastenfraktion, wie auch in den Mitochondrienfraktionen nachgewiesen werden. In den Gesamtextrakten der jeweiligen Zellkulturen konnte cry3 dagegen nicht detektiert werden.

Des Weiteren wurde die Lokalisation von Cryptochrom 3 durch Verwendung des affinitätsgereinigten cry3-Antikörpers #503 (Meier, 2004) auf Ultradünnschnitten von Mesophyllzellen aus cry3-überexprimierenden Pflanzen untersucht. Cry3 wurde hierbei mit einem goldgekoppelten Sekundärantikörper elektronenmikroskopisch detektiert. Abbildung 11 E-F zeigt die Aufnahme von Chloroplasten und Mitochondrien. Die Goldpartikel sind als schwarze Punkte

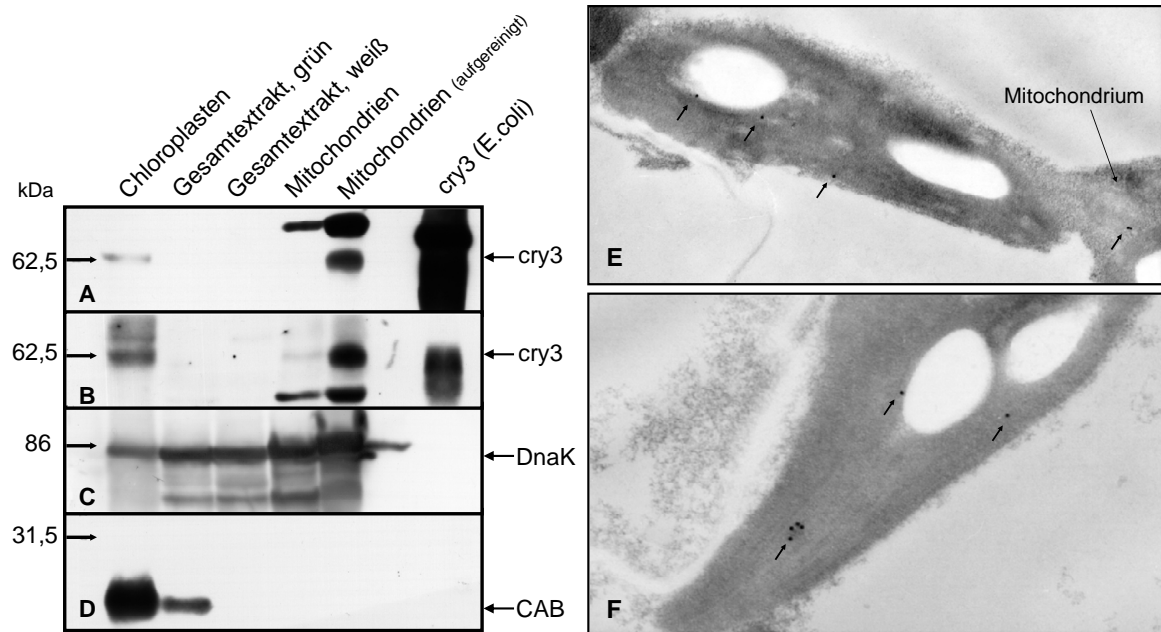


Abbildung 11: Cry3 ist in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert. (A-D) Die Western-blot Analyse zeigt eine Anreicherung von cry3 in Proteinextrakten aus Chloroplasten und Mitochondrien. Rekombinantes cry3 aus *E. coli* wurde als Kontrolle für den cry3-Antikörper verwendet. Die Nitrocellulosemembran wurde mit verschiedenen Antikörpern inkubiert: (A) Der affinitätsgereinigte cry3-AK #503. (B) Zweiter unabhängiger AK gegen cry3. (C) α DnaK gegen ein mitochondriales Protein. (D) CAB diente als plastidäres Marker-Protein. (E-F) Immunolokalisation von cry3 in Schnitten von Mesophyll-Zellen aus cry3-überexprimierenden Pflanzen. Cry3-Antikörper wurden mit Gold-markierten sekundären Antikörpern detektiert. Die Pfeile deuten auf die Goldpartikel, die hauptsächlich in Chloroplasten gefunden wurden. Bei den großen hellen Strukturen innerhalb der Chloroplasten handelt es sich um Stärkekörner.

zu erkennen und sind zusätzlich durch Pfeile markiert. Cry3 konnte durch diese Methode eindeutig in den Chloroplasten nachgewiesen werden und trat dort gehäuft auf. In einigen Fällen konnte Cryptochrom 3 auch in Mitochondrien identifiziert werden (Abbildung 11 E), allerdings waren die Mitochondrien in den Schnitten der in Lowicryl eingebetteten Zellen nicht immer leicht zu erkennen. Weitere elektronenmikroskopische Bilder sind in Abbildung 36 im Anhang beigelegt. In einem der Schnitte wurde cry3 im Nukleolus des Zellkerns detektiert (Abbildung 36 A). Die Lokalisation von Cryptochrom 3 in diesem Kompartiment konnte in unserer Arbeitsgruppe durch weitere Methoden bestätigt werden (J. Sommer, unpublizierte Daten).

3.2 Expression von Cryptochrom 3

3.2.1 CRY3 wird lichtabhängig exprimiert

Um weitere Hinweise auf eine biologische Funktion von Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, wurde die Expression von *cry3* untersucht. Um die Frage zu klären, ob *cry3* lichtabhängig exprimiert wird, wurde zunächst die mRNA-Expression von etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen untersucht. Etiolierte Keimlinge wurden nach 7 Tagen im Dunkeln für 12 h mit Rotlicht (662 nm, $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Blaulicht (445 nm, $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder Dunkelrotlicht (730 nm, $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt und mit der Dunkelkontrolle verglichen. Aus diesen Keimlingen wurde RNA isoliert und nach der reversen Transkription erfolgte die Quantifizierung der relativen *CRY3*-Transkriptmenge durch *realtime* PCR. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 12 dargestellt. Sowohl Blaulicht, wie auch Rotlicht bewirken eine geringe Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge nach 12 h. Den größten Effekt auf die *CRY3*-Transkriptmenge hatte jedoch die Bestrahlung mit dunkelrotem Licht, welches einen 5-10-fachen Anstieg der relativen Expression im Vergleich zur Dunkelkontrolle bewirkte.

Um die Induktion der *CRY3*-Expression noch genauer zu bestimmen, wurde eine kinetische Untersuchung der *CRY3*-Induktion durch Dunkelrot-Bestrahlung durchgeführt. Dazu wurden 5 Tage alte etiolierte *Arabidopsis* Keimlinge mit Dauer-Dunkelrot bestrahlt. Die relative *CRY3*-Transkriptmenge wurde vor Beginn der Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlungsbeginn bestimmt. Die Ergebnisse für den Ökotyp Landsberg erecta sind in Abbildung 13 A dargestellt. Nach 12 h Dunkelrotbestrahlung hatte sich die *CRY3*-Transkriptmenge um das 14fache erhöht. In den nächsten 12 h sank die Transkriptmenge dann aber schnell wieder fast bis auf den Ausgangswert ab. Es handelt sich somit um eine transiente Induktion von *CRY3* durch DR. Da die Dunkelrot-Antworten in Pflanzen in der Regel durch Phytochrom A reguliert werden, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob auch die *CRY3*-Expression durch Phytochrom beein-

flusst wird. In der *phyA*-Mutante ist die transiente *CRY3*-Induktion zum größten Teil unterdrückt, wobei nach 12 h DR noch ein 3-facher Anstieg der *CRY3*-Expression nachzuweisen ist (Abbildung 13 A). In der *phyA/B*-Doppelmutante ist dagegen keinerlei Anstieg der Tran-

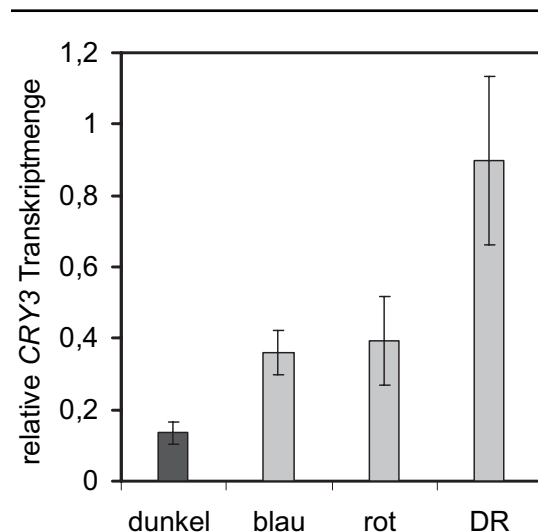


Abbildung 12: Lichtabhängige Expression von *cry3*. Die relative Transkriptmenge von etiolierte Keimlingen wurde durch *realtime* PCR nach 12 h Bestrahlung mit rot (662 nm , $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), blau (445 nm , $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und dunkelrot (730 nm , $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestimmt. Als Vergleich diente eine Dunkelkontrolle. Als Referenzgen zu Normierung für die *realtime* PCR wurde *UBQ* verwendet.

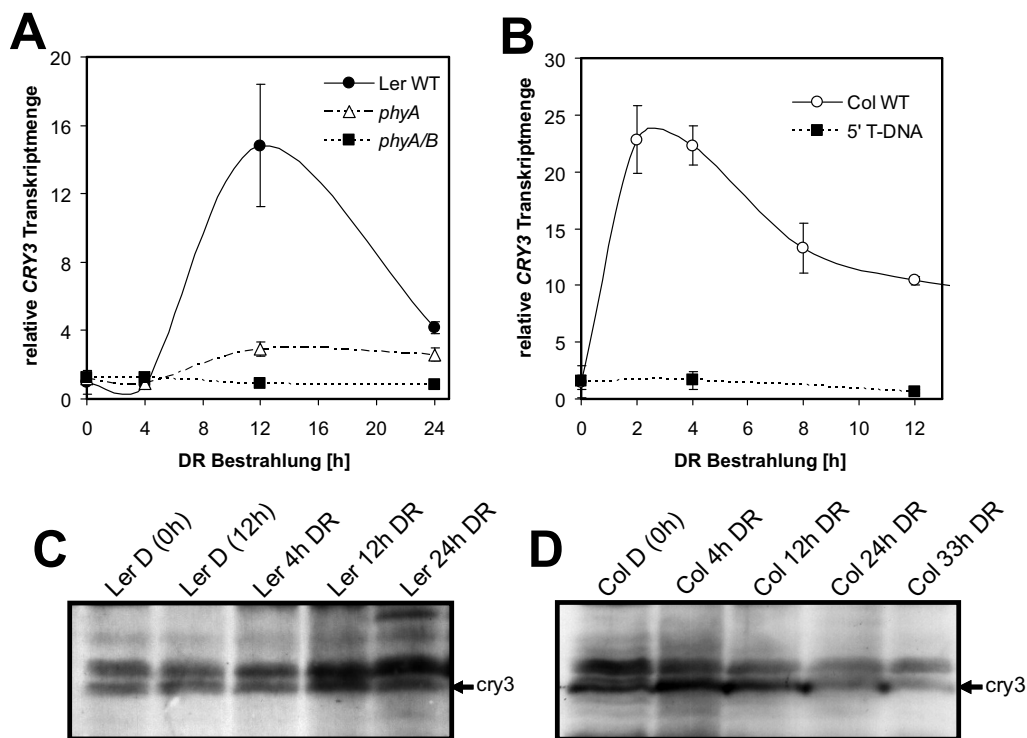


Abbildung 13: DR-Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge ist *phyA*-abhängig. Die relativen *CRY3*-Transkriptmengen von 5 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen nach DR-Bestrahlung ($\lambda[\text{max}]$ 730 nm, $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurden durch *realtime* PCR bestimmt. UBQ10 diente als Referenzgen für die PCR. (A) DR-Kinetik der *CRY3*-Expression für Ler WT, *phyA*- und *phyA/B*-Mutanten. (B) *CRY3*-Expression für Col WT und 5' T-DNA Insertionslinie. (C-D) Analyse der *cry3*-Proteinmenge nach DR-Bestrahlung für Ler WT (C) und Col WT (D).

skriptmenge zu erkennen. Im Gegensatz zum Ler-WT zeigen die Keimlinge des Ökotyps *Columbia* das Maximum der DR-induzierten *CRY3*-Expression bereits nach 2-4 h. Nach 12 h Bestrahlung ist die Transkriptmenge schon wieder deutlich reduziert (Abbildung 13 B). Die Reaktion auf DR wurde zusätzlich in einer T-DNA-Insertionslinie (5' T-DNA) untersucht. Diese Linie besitzt eine Insertion im *CRY3*-Promotorbereich, 80 bp vor dem Startcodon. Obwohl diese Mutante unter Weißlicht-Bedingungen keine Expressions-Unterschiede im Vergleich zum WT aufweist (Abbildung 16 E), ist in Abbildung 13 B deutlich zu erkennen, dass die *CRY3*-Expression in dieser Linie nicht durch DR induziert wird.

Um zu überprüfen, ob sich diese starke transiente Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge auch auf die Proteinebene auswirkt, wurde die *cry3*-Proteinmenge nach DR-Bestrahlung durch eine *Western-blot* Analyse untersucht. Die Ler-WT- und Col-WT-Keimlinge wurden ebenso wie bei der Transkriptanalyse behandelt. Nach der Proteinextraktion erfolgte eine Auftrennung durch SDS-PAGE. Cry3 wurde nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch den *cry3*-Antikörper SA4288 nachgewiesen. Um die Proteinmengen vergleichen zu können, war jede Spur des Gels mit 100 μg Gesamtprotein beladen worden. Die Ergebnisse dieses Versuchs nach ECL-Detektion sind in Abbildung 13 C-D dargestellt. Die *cry3*-Proteinmengen wurden zwar nicht so stark wie die Transkripte durch DR-Licht induziert, eine Regulation des

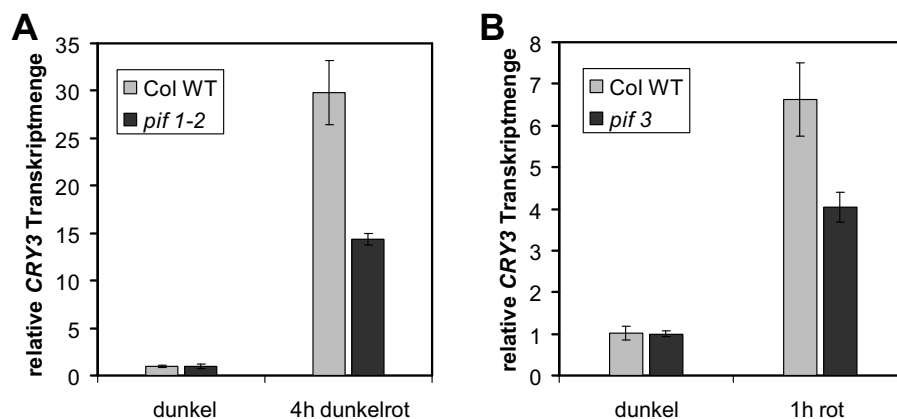


Abbildung 14: Die Induktion der *CRY3*-Transkripte wird durch PIFs beeinflusst. (A) Die *CRY3*-Transkriptmenge im Dunkeln und nach 4 h DR-Bestrahlung von WT und *pif1-2*-Mutante wurde durch *realtime* PCR bestimmt. (B) Die Daten der *CRY3*-Transkriptmengen der *pif3*-Mutante im Vergleich zum WT nach 1 h Rotlicht-Bestrahlung wurden aus der *microarray* Analyse von Monte et al. (2004) entnommen.

cry3-Proteins ähnlich der RNA-Expression war aber dennoch deutlich zu erkennen. Keimlinge vom Ökotyp Landsberg erecta erreichten nach 12 h DR-Bestrahlung die maximale *cry3*-Proteinmenge (Abbildung 13 C), bei Columbia-Keimlingen wird das Maximum bereits nach 4 h erreicht (Abbildung 13 D).

Aus den von Monte et al. (2004) veröffentlichten *microarray* Daten ist zu erkennen, dass das Fehlen des Transkriptionsfaktors PIF3 die phytochromabhängige Induktion vieler Gene durch Rotlicht beeinflusst. Die veröffentlichten Daten zur Expression von *CRY3* in der *pif3*-Mutante sind in Abbildung 14 B zusammengestellt. WT und *pif3*-Mutanten wurden 4 Tage im Dunkeln angezogen und dann für 1 h mit Rotlicht bestrahlt. Die RNA wurde nach der Extraktion einer *microarray* Analyse unterzogen (Monte et al., 2004). Die *CRY3*-Expression wird zwar auch in der *pif3*-Mutante noch durch Rotlicht induziert, jedoch beträgt diese Induktion nur ca. 60% der Rotlichtinduktion in WT-Keimlingen. Mit PIF1 wurde ein phytochromabhängiger Transkriptionsfaktor identifiziert, der ebenfalls an der Plastidenentwicklung beteiligt ist (Huq et al., 2004). Daher wurde in dem in Abbildung 14 A dargestellten Experiment untersucht, ob das Fehlen von PIF1 ebenfalls die lichtabhängige Expression von *CRY3* beeinflusst. Dazu wurden die *CRY3*-Transkriptmengen von etiolierten Keimlingen im Dunkeln und nach 4 h Dunkelrot-Bestrahlung durch *realtime* PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde dabei UBQ verwendet. In der *Arabidopsis pif1-2*-Mutante ist die *CRY3*-Induktion nach 4 h DR im Vergleich zum WT um die Hälfte reduziert. Somit wird der phytochromabhängige Anstieg der *CRY3*-Transkriptmenge sowohl von PIF1, als auch von PIF3 beeinflusst.

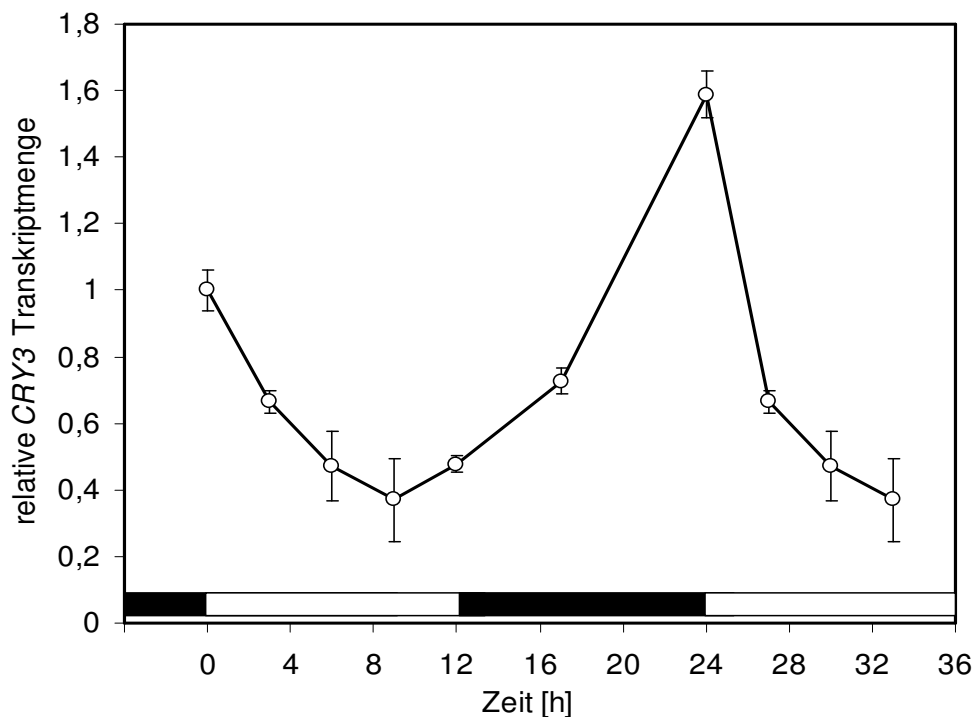


Abbildung 15: *CRY3* wird diurnal exprimiert. Die *CRY3*-Transkripte in 12 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in einem 12 h Licht/12 h Dunkel-Zyklus durch *realtime* PCR quantifiziert. Als Referenzgen wurde UBQ10 verwendet. Die schwarzen und weißen Balken in der Abbildung symbolisieren jeweils die Dunkel- und Lichtphase.

3.2.2 Diurnale Expression von *CRY3*

Eine Vielzahl von Genen in Pflanzen wird durch die Innere Uhr gesteuert. Auch für das cryDASH-Gen aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) wurde ein circadianer Rhythmus der Genexpression nachgewiesen (Facella et al., 2006). Zudem sind die beiden anderen Cryptochrome aus *Arabidopsis*, cry1 und cry2, an der Synchronisation der Inneren Uhr beteiligt und sind selbst circadian exprimiert. Daher wurde hier untersucht, ob auch *CRY3* aus *Arabidopsis thaliana* einen Rhythmus in der tageszeitlichen Expression aufweist. Für diesen Versuch wurden *Arabidopsis* Keimlinge für 12 Tage unter Weißlichtbedingungen in einem Zyklus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit auf Erde angezogen. Schließlich wurden in einem Abstand von 2-5 h verteilt über 33 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. Nach der reversen Transkription der isolierten RNA erfolgte die Quantifizierung der relativen *CRY3*-Transkriptmenge durch *realtime* PCR mit UBQ als Referenzgen. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse dieses Versuchs zeigen eine eindeutige diurnale Expression von Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana*. Die Expression von *CRY3* erreichte am frühen Morgen ihren Höhepunkt und sank im Laufe des Tages (weißer Balken) immer weiter ab. Erst zum Beginn der Dunkelphase (schwarzer Balken) stieg die Menge an *CRY3*-Transkripten wieder an.

3.3 Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3

3.3.1 Transgene Cryptochrom 3 Linien

Die biologische Funktion von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* sollte in dieser Arbeit durch reverse Genetik untersucht werden. Dazu sollten Mutanten mit veränderter *CRY3*-Expression bzw. *CRY3* knock-out Linien auf phänotypische Unterschiede im Vergleich zu WT-Pflanzen analysiert werden. Da bei Beginn dieser Arbeit noch keine Insertionslinien für Cryptochrom 3 verfügbar waren, wurden zunächst zusätzlich zu *cry3*-überexprimierenden Linien mehrere *CRY3*-RNAi-Linien mit verringerter *CRY3*-Expression hergestellt. Im Laufe der Arbeit wurden noch weitere T-DNA- und Transposon-Insertionslinien für *CRY3* verfügbar. Eine T-DNA-Insertionslinie mit einer Insertion im *CRY3*-Promotorbereich wurde durch ein scree-

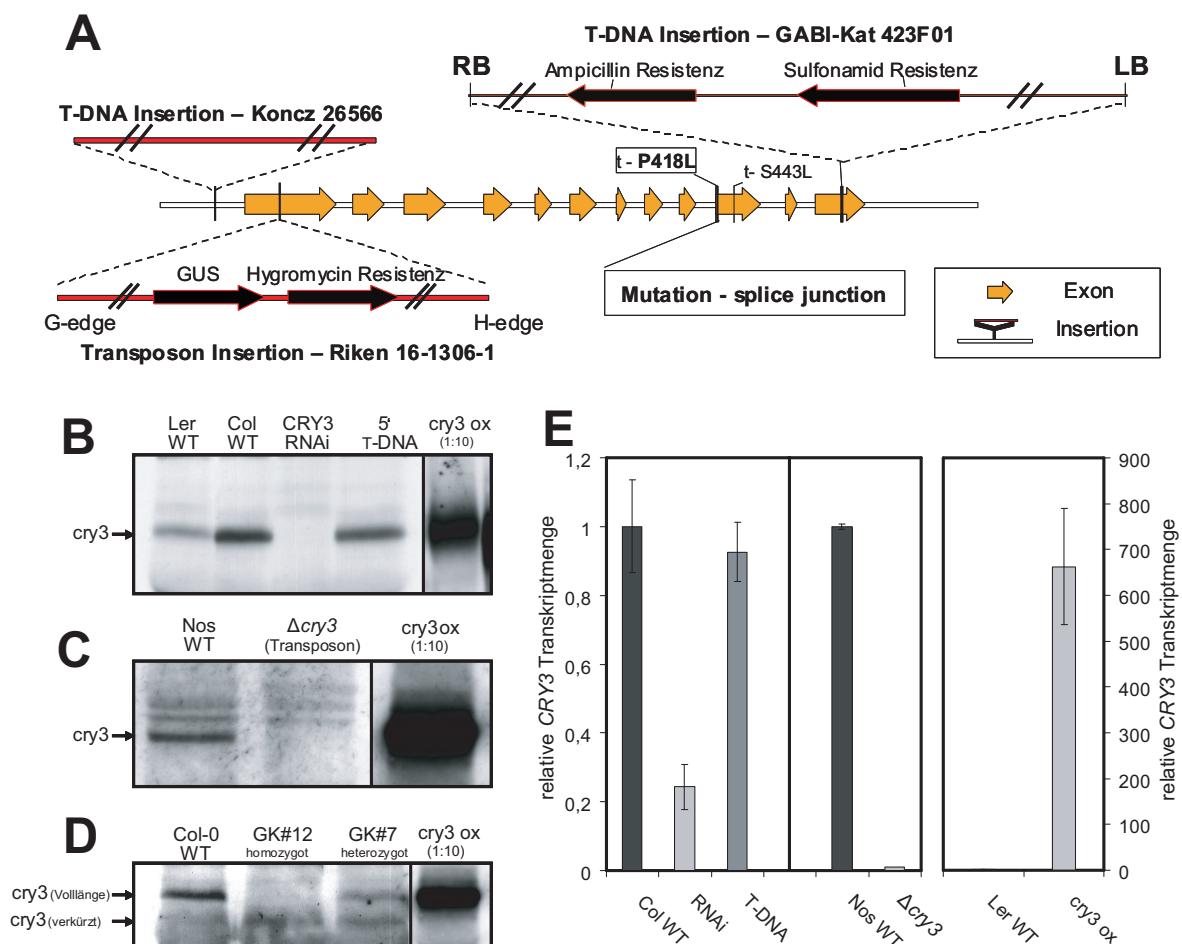


Abbildung 16: Charakterisierung der verwendeten CRY3-Linien. (A) Schematische Darstellung der *CRY3*-Insertionslinien. (B-D) Western Analyse von *cry3* in Mutanten und Überexpressionslinien. 100 µg Gesamtproteinextrakt (10 µg bei *cry3*ox) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem *cry3*-Antikörper SA4288 analysiert. (E) Quantifizierung der relativen *CRY3*-Transkriptmengen durch *realtime* PCR. UQB10 wurde als Referenzgen verwendet. Die Transkriptmengen der transgenen Pflanzen sind den entsprechenden WT Pflanzen gegenübergestellt.

ning der Csaba Koncz T-DNA-Kollektion am Max Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln identifiziert. Eine weitere T-DNA-Linie mit einer Insertion im letzten *CRY3*-Exon wurde in der Datenbank der Gabi-Kat-Kollektion gefunden. Eine tatsächliche *cry3 knock-out* Linie mit einer Transposon-Insertion wurde schließlich in der Datenbank des japanischen Riken-BioResource-Centers (Kuromori et al., 2004; Ito et al., 2005) entdeckt. Alle erhaltenen Linien wurden in dieser Arbeit analysiert und es wurden homozygote Linien dieser Mutanten hergestellt.

Cry3-Überexpression Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden die transgenen Pflanzen zunächst durch *Western-blot* Analysen mit dem *cry3*-Antikörper SA4288 auf Überexpression (ox) von *cry3* getestet. Wie in Abbildung 17 A gezeigt, wiesen die meisten getesteten ox-Linien eine deutliche Überexpression von *cry3* auf. Die Linie *cry3ox-6* exprimierte die höchste Menge an Cryptochrom 3. Bei einigen Linien wie z.B. *cry3ox-10* war dagegen im *Western-blot* kein *cry3* mehr nachweisbar. Da für diese Linie auch eine besonders hohe Zahl von T-DNA-Insertionen nachgewiesen wurde, handelt es sich hierbei möglicherweise um eine Form des *post-transcriptional gene silencing*. Die Überexpressionslinie *cry3ox-6* wurde dann einer weiteren Analyse zur ungefähren Bestimmung der Zahl an T-DNA Insertionen (ähnlich der Methode von Mason et al., 2002) unterzogen. Die DNA der durch Selbstung entstandenen Nachkommen der *cry3ox-6* Linie wurde mittels *realtime* PCR analysiert. Eine homozygote Pflanzenlinie mit einer einzelnen Insertion sollte in diesem Fall die doppelte Menge an *cry3*-kodierender DNA besitzen wie eine WT-Pflanze. Als Referenz kann hierzu jede beliebige andere DNA-Sequenz verwendet werden. In diesem Fall wurde wie bei anderen in dieser Arbeit beschriebenen *realtime* PCR-Anwendungen die UBQ-Sequenz verwendet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 17 B dargestellt. Die transgene Linie *cry3ox 6-3* besitzt genau die doppelte Menge an *CRY3*-spezifischer DNA, wobei die anderen getesteten Linien nur die 1,5fache Menge aufweisen. Das lässt den Schluss zu, dass die Linie *cry3ox 6-3* eine homozygote transgene Überexpressionslinie mit einer einzelnen Insertion ist. Die übrigen Linien sind demnach heterozygot für diese T-DNA-Insertion. Um dieses Ergebnis noch einmal zu bestätigen, wurde eine weitere *realtime* PCR-Analyse mit T-DNA-spezifischen Primern durchgeführt. Da diese Sequenz in WT-Pflanzen nicht vorkommt, ist bei der homozygoten Linie im Vergleich zu den heterozygoten Linien die doppelte Menge an pFGC5941-DNA zu erwarten. Diese Annahme konnte, wie in Abbildung 17 C gezeigt, bestätigt werden. Die Nachzucht der Überexpressionslinie *cry3ox 6-3* wurde schließlich für alle weiteren Experimente verwendet und wird nachfolgend nur als *cry3ox* bezeichnet. Die Expression von *cry3* in dieser Linie wurde nochmals getestet und ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Transkriptmenge der Überexpressionslinie ist im Vergleich zum WT ungefähr 650fach erhöht (Abbildung 16 E), wobei die exprimierte Proteinmenge mindestens 100 mal höher ist, als beim WT (Abbildung 16 B-D). Da das *cry3*-Signal in der *Western-blot* Analyse bei der *cry3ox*-Linie so stark war, wurde von dieser Linie nur $\frac{1}{10}$ des Gesamtextrakts

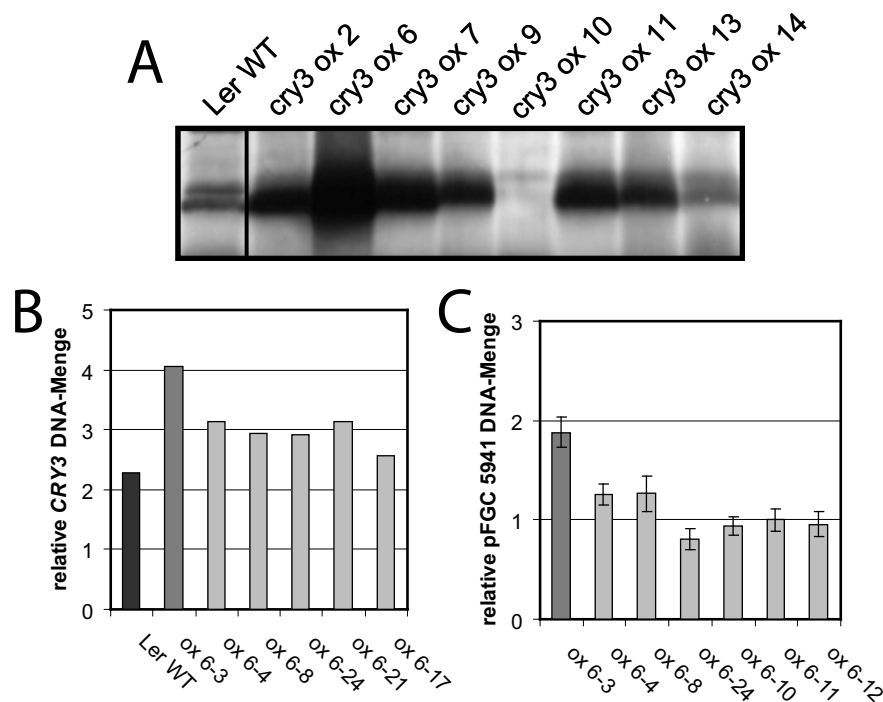


Abbildung 17: Screening nach homozygoten cry3 Überexpressionslinien. (A) Western blot zur Analyse der cry3-Proteinmenge von verschiedenen Überexpressionslinien im Vergleich zum WT. (B) Die relative CRY3-DNA-Menge wurde zur Bestimmung der Insertionszahl durch *realtime* PCR mit CRY3-spezifischen Primern bestimmt. (C) Analyse durch *realtime* PCR zur Bestimmung der relativen T-DNA-Menge in transgenen Pflanzen mit pFGC5941 (T-DNA)-spezifischen Primern.

verwendet, um die cry3-Proteinmengen besser vergleichen zu können.

CRY3 RNAi knock-down Die CRY3-RNAi-Linien wurden nach der Transformation mit dem pFGC5941-RNAi-Vektor auf die Expression ihrer CRY3-Transkripte hin getestet. Dazu wurde zunächst die RNA aus WT-Keimlingen und Keimlingen verschiedener transgener Linien isoliert. Nach der reversen Transkription wurde die Reduktion der CRY3-Expression durch *realtime* PCR bestimmt. Die CRY3-Expression der einzelnen transgenen Linien wies große Unterschiede auf (Abbildung 18 A). Bei einigen Linien war die CRY3-Transkriptmenge im Vergleich zum WT kaum verändert. Die größten Reduktionen der CRY3-Transkriptmengen in den RNAi-Linien betrugen 20-25% im Vergleich zum WT. Im nächsten Schritt wurden die RNAi-Linien mit reduzierten CRY3-Transkriptmengen auf ihre ungefähre Insertionszahl getestet. Dies erfolgte ebenso wie bei den Überexpressionslinien durch *realtime* PCR. Für die Linie RNAi-15 (T₁-Generation) wurde dabei die geringste Menge an T-DNA spezifischer DNA nachgewiesen. Die Nachkommen dieser Linie wurden schließlich einer Segregationsanalyse unterzogen, um eine homozygote RNAi-Linie zu erhalten. Dazu wurden die Keimlinge der T₂-Generation mit BASTA behandelt und der Anteil der resistenten Pflanzen wurde für verschiedene Linien bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 18 C gezeigt. Nur bei der Linie RNAi 15-7 weisen alle Pflanzen eine BASTA-Resistenz auf. Bei den ande-

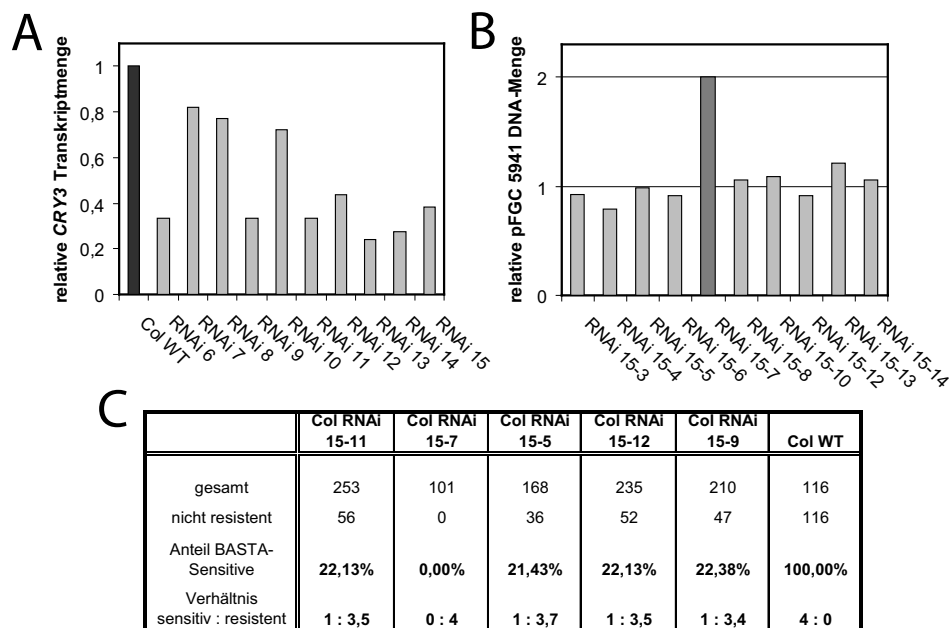


Abbildung 18: Screening auf homozygote *CRY3*-RNAi-Linien. (A) Die relative *CRY3*-Transkriptmenge in den RNAi-Linien wurde durch *realtime* PCR mit UBQ10 als Referenz untersucht. (B) Die DNA der Nachkommen der Linie RNAi 15 wurden durch *realtime* PCR auf die relative T-DNA Menge untersucht. Als Referenz diente ebenfalls UBQ10. (C) Ergebnis der Segregationsanalyse der Linie RNAi 15. Die Keimlinge der verschiedenen Linien wurden auf BASTA-Resistenz getestet.

ren getesteten Linien war eine Segregation der Resistenz in einem Verhältnis von ungefähr 1 : 3,5 zu beobachten. Dieses Verhältnis deutet auf eine Einzelinsertion der T-DNA in dieser Linie hin, da hier nur eine geringe Abweichung vom theoretischen Verhältnis von 1:3 vorliegt. Zusätzlich wurde die T-DNA-spezifische DNA-Menge dieser Linien durch *realtime* PCR bestimmt. Die resistente Linie RNAi 15-7 enthält im Vergleich zu den anderen Linien genau die doppelte Menge an T-DNA-spezifischer DNA (Abbildung 18 B). Demnach handelt es sich bei der Linie RNAi 15-7, die für alle weiteren Experimente verwendet wurde, um eine homozygote Linie mit einer einzelnen Insertion. Die Ergebnisse einer genaueren Analyse dieser Linie ist noch einmal in Abbildung 16 zusammengefasst. Die *CRY3*-Transkriptmenge ist um 80% reduziert und in *Western-blot* Analysen ist das *cry3*-Protein in der RNAi-Linie nicht mehr nachzuweisen.

***CRY3* T-DNA-Insertionen** Da zu Beginn dieser Arbeit keine Mutanten mit einer Insertion im *CRY3*-Gen verfügbar waren, wurde in der Csaba Koncz T-DNA-Kollektion am MPI für Züchtungsforschung in Köln nach *cry3*-Mutanten gescreent. Die Durchführung des *screenings* ist im Methodenteil beschrieben. Eine mögliche Insertion in *CRY3* konnte zunächst in den Pools 6 und G durch PCR nachgewiesen werden (*screening* Schema im Anhang, Abbildung 37). Somit wurden in der zweiten *screening*-Runde die möglichen Pools 66, 166, 266 und 366 auf die Insertion getestet. Das entsprechende PCR-Produkt konnte im 100er Pool 266 nachgewiesen werden. Durch das *screening* dieser 100 Einzelpflanzen wurde die ge-

suchte T-DNA-Insertion in der Pflanzenlinie 26566 gefunden. Das Ergebnis einer weiteren PCR-Analyse dieser Linie ist in Abbildung 19 A gezeigt. Wie erwartet ergab die PCR mit den Primerkombinationen *T-DNA LB / CRY3 upstream* und *T-DNA RB / CRY3 downstream* jeweils ein PCR-Produkt von entsprechender Größe. Aber auch die Kombination von *T-DNA LB* mit dem *CRY3 downstream*-Primer hatte ein Produkt von mittlerer Größe zur Folge. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Linie, wie in Abbildung 19 B schematisch dargestellt, mindestens 2 T-DNA-Insertionen von entgegengesetzter Orientierung im *CRY3*-Promotorbereich enthält. Durch Sequenzierung des Insertionsbereiches konnte eine T-DNA-Insertion 81 bp vor dem *CRY3*-Startcodon lokalisiert werden. In der Nähe dieser Insertion ist zudem eine sogenannte G-Box vorhanden. Dabei handelt es sich um ein spezifisches Sequenzmotiv, welches vor allem bei lichtregulierten Genen zu finden ist und das für die Interaktion mit PIF-Proteinen bekannt ist. Die genaue Lage der Insertionen ist im Anhang in Abbildung 38 noch einmal dargestellt. Um eine homozygote Insertionslinie zu erhalten, wurde ein PCR-Test mit T-DNA-flankierenden Primern durchgeführt. Nur bei homozygoten Pflanzen konnte mit dieser Primerkombination kein Produkt amplifiziert werden. Eine der homozygoten Linien (26566 #11) wurde für alle weiteren Experimente verwendet und ist nachfolgend nur als 5' *T-DNA* bezeichnet. Bei Pflanzen, die unter Weißlichtbedingungen angezogen wurden, konnte kein Unterschied in der *CRY3*-Expression im Vergleich zum WT festgestellt werden. Sowohl die *CRY3*-Transkriptmenge (Abbildung 16 E), wie auch die Proteinmenge (Abbildung 16 B) waren in der Mutante und dem WT nahezu identisch.

In der Datenbank der GABI-Kat T-DNA-Kollektion (Rosso et al., 2003) wurde nachfolgend eine weitere *Arabidopsis*-Linie (423F01) mit einer Insertion im *CRY3*-Gen identifiziert. Diese Linie enthält eine Insertion im letzten Exon des *CRY3*-Gens (Schema in Abbildung 16 A). Durch eine PCR mit Primern, die die Insertionsstelle flankieren, wurde die Linie auf homozygote Pflanzen für die Insertion getestet. Zur Kontrolle wurden die DNA-Proben nochmals mit *CRY3*- und T-DNA-spezifischen Primern getestet, die bei allen transgenen Pflanzen die

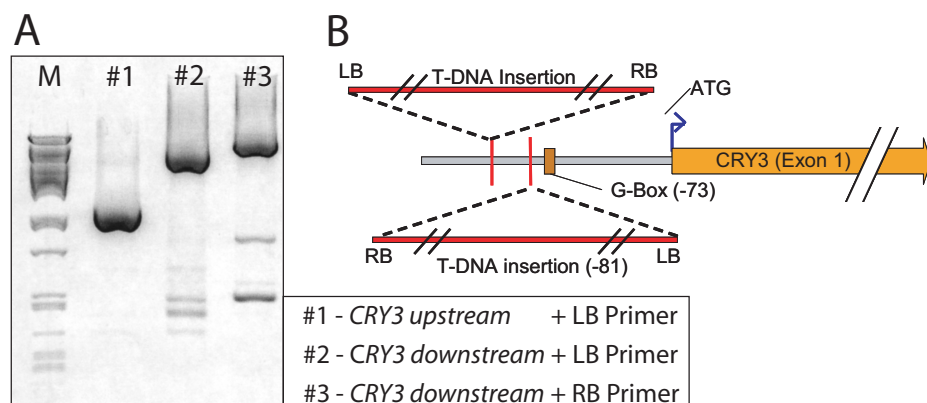


Abbildung 19: Charakterisierung der 5' T-DNA-Insertion. (A) Die Orientierung der Insertion wurde durch PCR überprüft. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. (B) Schema der T-DNA-Insertionen im *CRY3*-Promotorbereich.

Amplifikation eines PCR-Produktes ermöglichen. Die homozygote Linie #12 wurde für die weiteren Experimente verwendet. Zur genauen Untersuchung der T-DNA-Insertion wurde eine Sequenzanalyse der Insertionsstelle durchgeführt. Die Insertion befindet sich demnach im letzten *CRY3*-Exon genau 120 bp vor dem Stopp-Codon. Das erste durch die Insertion neu entstandene Codon stellt ein Stopp-Codon dar, so dass durch den vorzeitigen Translationsabbruch in dieser Linie die letzten 40 Aminosäuren von *cry3* deletiert werden. Dabei entsteht kein Aminosäureaustausch. Wie in Abbildung 16 D gezeigt, wurde das *cry3*-Protein von der homozygoten Linie GK#12 und der heterozygoten Linie GK#7 durch eine *Western-blot* Analyse untersucht. Das verkürzte Protein in Linie #12 ist als schwache Bande im *Western-blot* zu erkennen. In der heterozygoten Linie sind dagegen sowohl das verkürzte, wie auch das Vollängen-*cry3* zu detektieren.

Cry3-knock-out-Mutante durch Transposon-Insertion In der Datenbank des Riken-Bio-Resource-Centers in Japan (Kuromori et al., 2004; Ito et al., 2005) wurde schließlich die Transposon-Insertionslinie 16-1306-1 (pst20171) mit einer Insertion im kodierenden Bereich des ersten Exons von *CRY3* identifiziert. Diese Linie stellte somit eine vielversprechende *cry3-knock-out*-Mutante dar. Das Saatgut dieser Linie wurde vom Riken-Institut bezogen und die Linie wurde genauer charakterisiert. Um homozygote Pflanzen für die *CRY3*-Insertion zu erhalten, wurden sie durch einen PCR-Test mit flankierenden *CRY3*-Primern überprüft. Konnte mit der DNA dieser Pflanzen kein Produkt amplifiziert werden, waren diese homozygot für die Transposon-Insertion. Zur Kontrolle wurden diese DNA-Proben mit einem transposonspezifischen und einem *CRY3*-spezifischen Primer getestet. Mit dieser Kombination konnte aus allen Pflanzen, die eine Transposoninsertion in *CRY3* enthalten, ein Produkt amplifiziert werden. Um die Deletion des *CRY3*-Gens zu bestätigen, wurde zunächst die *CRY3*-Transkriptmenge von WT und *cry3*-Mutante durch *realtime* PCR quantifiziert. Dazu wurden Primer verwendet, die stromabwärts der Insertionsstelle binden. Wie in Abbildung 16 E dargestellt, ist im Gegensatz zum WT bei der *cry3*-Mutante kein Transkript nachweisbar. Das PCR-Signal unterschied sich nicht vom Hintergrund der H₂O-Kontrolle. Auch das *cry3*-Protein ist bei der Transposon-Linie im Gegensatz zum WT durch eine *Western-blot* Analyse nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 16 C).

Um einen Hinweis auf die Anzahl der Insertionen in dieser Linie zu erhalten, wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Nachkommen einer ursprünglich erhaltenen heterozygoten Insertionslinie verwendet. Die Selektion der Pflanzen auf Hygromycin-Platten führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis, da auch die Kontrolle mit einer homozygoten Linie keine 100% ige Hygromycin-Resistenz vermittelte. Daher wurde schließlich eine molekulare Segregationsanalyse durchgeführt. Durch einen PCR-Test mit insertionsflankierenden und transposonspezifischen (*aph4*) Primern wurden 42 durch Selbstung erhaltene Nachkommen einer heterozygoten Linie untersucht. Dabei konnte zwischen WT-Pflanzen, homozygoten Mutanten und heterozygoten Mutanten unterschieden werden. Bei Verwendung

von DNA aus WT-Pflanzen wurde mit den flankierenden Primern ein Produkt amplifiziert, die Transposonprimer ergaben jedoch kein Produkt. Aus DNA-Extrakten von heterozygoten Pflanzen konnte dagegen mit beiden Kombinationen ein Produkt amplifiziert werden. Wurde schließlich nur mit den Transposonprimern ein PCR-Produkt generiert, so handelte es sich bei der entsprechenden Pflanze um eine homozygote *cry3*-Mutante. Die PCR-Produkte nach Auftrennung im Agarosegel sind in Abbildung 39 A exemplarisch für einige Linien gezeigt. Von den 42 getesteten Pflanzen wurden 20 Pflanzen als heterozygot, 11 Pflanzen als homozygot für das WT-Allel und 11 Pflanzen als homozygot für die Mutation identifiziert. Dieses Verhältnis von 1 : 1,82 : 1 entspricht dem erwarteten Verhältnis von 1:2:1 bei einer einzelnen Transposoninsertion. Der χ^2 -Test zeigt mit einem Wert von 0,0952, dass unter Annahme dieser Hypothese die erhaltene Abweichung in 99,5% der Fälle zu erwarten ist. Andere Hypothesen mit mehr als einer Insertionsstelle sind dagegen abzulehnen. Für die folgenden Experimente wurde somit eine homozygote Transposon Linie ohne zusätzliche Insertionen verwendet. Diese Linie wird nachfolgend nur als $\Delta cry3$ bezeichnet.

Als Hintergrund der $\Delta cry3$ -Linie wurde von Fedoroff und Smith (1993) der Ökotyp Nossen angegeben. Daher wurden zunächst alle weiteren Versuche mit diesem Ökotyp als WT-Kontrolle durchgeführt. Um ausschließen zu können, dass beobachtete Effekte dennoch auf Unterschiede im verwendeten Ökotyp zurückzuführen waren, wurden zusätzlich die WT-Pflanzen aus der Segregation der heterozygoten Transposonlinie (WT*) als Kontrolle verwendet.

CRY3 Tilling-Linien Zur Identifikation von weiteren *cry3*-Mutanten wurde die TILLING-Methode (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) angewendet (Till et al., 2003). Bei dieser Methode der reversen Genetik werden *Arabidopsis* Samen zunächst mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisiert, was zu C/G nach A/T Punktmutationen führt. Aus den Pflanzen der T₂-Generation nach Selbstung wird schließlich DNA für das *screening* extrahiert. Ein Fragment des gesuchten Gens wird durch PCR amplifiziert, wobei der 5'-Primer Fluoreszenzmarkiert ist. Durch Denaturierung und *reannealing* der PCR-Produkte aus gepoolter DNA entstehen *mismatches*, wenn im untersuchten Abschnitt Punktmutationen vorhanden sind. Diese *mismatches* können durch Verwendung der CEL I-Nuklease geschnitten werden und durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Mutationen als verkürzte Produkte nachgewiesen.

EMS-mutagenisierte Linien wurden in unserem Auftrag vom *Seattle Arabidopsis Tilling Projekt* auf Punktmutationen im *CRY3*-Gen untersucht. Das *screening* ergab einige Linien mit Punktmutationen in *CRY3*, wobei es sich bei einer Linie um eine Mutation der *splice junction* handelte. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung 40 und 41 dargestellt. Die Samen der Linien 13, 14 und 17 wurden anhand der angegebenen *stock*-Nummer vom NASC bestellt. Bei der *splice junction* Mutante ist die Erkennungssequenz AG vor dem 10. Exon zu AA mutiert. Dadurch verschiebt sich die AG-Sequenz um ein bp, was voraussichtlich zu einem *frameshift* der nachfolgenden Sequenz führen sollte. In diesem Fall würde die Translation nach

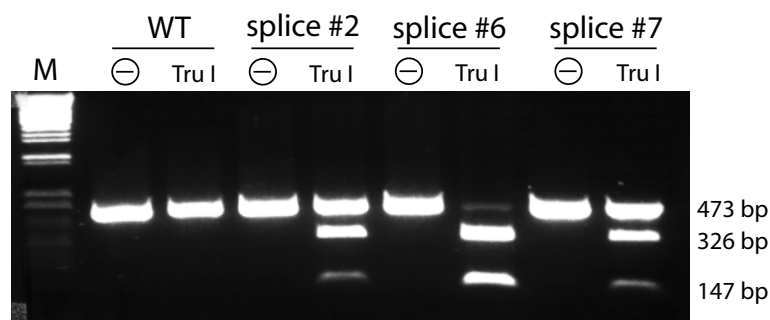


Abbildung 20: Screening der *splice junction* Mutante. Aus der DNA von WT- und verschiedenen *splice junction*-Linien wurde ein PCR-Produkt (473 bp) mit der Mutation amplifiziert. Nach einem Restriktionsverdau mit Tru I für 5 h bei 65°C wurden die Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

wenigen Aminosäuren durch ein Stopcodon beendet. Da es sich bei dieser Linie sehr wahrscheinlich um einen funktionellen *knock-out* handelt, wurde diese Linie weiter getestet und es wurden homozygote Pflanzen selektiert. Durch den Nukleotid-Austausch ist in der Mutante eine neue Mse I-Schnittstelle generiert worden, wodurch sie von WT-Pflanzen zu unterscheiden ist. Zunächst wurde dazu im Bereich der Mutation mit den Primern #1(13.09.06) und #2(13.09.09) ein 473 bp großes PCR-Produkt amplifiziert. Durch einen Verdau mit Mse I bzw. Tru I, einem Isoschizomer von Mse I, entstehen in einer Mutante zwei neue Fragmente mit einer Größe von 326 und 147 bp. Da heterozygote Pflanzen nur ein *CRY3*-Allel mit dieser neuen Schnittstelle tragen, konnten bei diesen Pflanzen nach dem Tru I-Verdau 3 DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Bei homozygoten Linien wurde das PCR-Produkt dagegen vollständig verdaut, so dass nur die beiden kleineren Fragmente (326 und 147 bp) vorhanden waren. In Abbildung 20 ist das Ergebnis des Tru I-Verdaus der PCR-Produkte aus verschiedenen Mutantenlinien sowie der WT-Kontrolle gezeigt. Dabei konnte die Linie splice #6 als homozygot für die Mutation der *splice junction* in *CRY3* identifiziert werden. Das Pflanzenwachstum dieser Mutante ist im Vergleich zum WT jedoch stark verzögert und die Mutanten blieben bis zur Samenbildung in ihrer Entwicklung stark zurück. Da dieser Unterschied in anderen *cry3*-Mutanten nicht auftrat, ist davon auszugehen, dass diese Linie noch andere Mutationen enthält, die für das schlechte Wachstum verantwortlich sind. Diese *cry3*-Mutante wurde daher für weitere Analysen zur *cry3*-Funktion nicht verwendet. Vor einer weiteren Verwendung müssten die unerwünschten Mutationen zunächst durch Rückkreuzung mit dem WT entfernt werden, was naturgemäß extrem zeitaufwendig ist.

3.3.2 Wachstum und Entwicklung

Untersuchungen zum Einfluss von *cry3* auf verschiedene Wachstumsparameter Die $\Delta cry3$ -Mutante, die 5' T-DNA Linie und die *cry3*-Überexpressions-Linie wurden zunächst auf phänotypische Unterschiede bezüglich ihres Wachstums und ihrer Entwicklung untersucht. Dazu wurde die Keimungsfähigkeit, das Hypokotylwachstum, das Wurzelwachstum und die Kotyledonengröße unter verschiedenen Lichtbedingungen getestet. Hinsichtlich der Keimungsfähigkeit konnten unter bestimmten Bedingungen Unterschiede zwischen dem Nos-WT und der $\Delta cry3$ -Linie, sowie zwischen der 5' T-DNA-Linie im Vergleich zum entsprechenden WT festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Keimungsversuche werden in Abschnitt 3.3.4 ausführlich dargestellt. Die getesteten *cry3*-Linien wiesen jedoch weder im Weißlicht, im Blaulicht, im Rotlicht, im Dunkelrotlicht, noch in Dunkelheit ein verändertes Hypokotyllängenwachstum im Vergleich zum jeweiligen WT auf. Auch bei Wurzelwachstum und Kotyledonengröße war keine Veränderung bei der 5' T-DNA-Linie und der Überexpressionslinie feststellbar. Lediglich bei der $\Delta cry3$ -Mutante konnte im Vergleich mit der Nos-WT-Linie 5 Tage nach der Keimung ein geringeres Wurzelwachstum und kleinere Kotyledonen unter verschiedenen Lichtbedingungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von *cry3* auf diese Entwicklungsunterschiede konnte jedoch durch weitere Vergleiche mit den WT*-Linien nicht bestätigt werden. Diese WT-Linien wurden aus einer heterozygoten $\Delta cry3$ -Linie selektiert. Die Entwicklung dieser Linien war im Vergleich mit der Nos-WT-Linie teilweise sogar stärker beeinflusst als die Entwicklung der getesteten $\Delta cry3$ -Mutante. *Cry3* scheint demnach nicht für das veränderte Wurzelwachstum und die geringere Kotyledonengröße in dieser Linie verantwortlich zu sein. In späteren Entwicklungsstadien der Pflanzen, wie dem Rosettenwachstum und der Blühentwicklung unterscheidet sich die $\Delta cry3$ -Mutante schließlich nicht mehr vom Nos-WT. Auch die anderen getesteten Linien sind in diesem Stadium nicht von WT-Pflanzen zu unterscheiden.

Untersuchungen zum Einfluss von *cry3* auf Entwicklung der Photosynthese-Pigmente

Um einen möglichen Einfluss von *cry3* auf die Entwicklung der Photosynthese-Pigmente zu untersuchen, war zunächst der Chlorophyllgehalt in den Keimlingen der einzelnen *CRY3*-Linien durch Absorptionsspektroskopie bestimmt und miteinander verglichen worden. Da hierbei für *cry3* keine Auswirkung auf den absoluten Chlorophyll-Gehalt beobachtet werden konnte, wurde daher in den in Abbildung 21 gezeigten Experimenten ein möglicher Einfluss auf die Protochlorophyllid-Akkumulation und die Chlorophyll-Bildung während der Ergrünungsphase der Keimlinge untersucht. Die Pigmente aus etiolierten Keimlingen wurden dazu mit DMF extrahiert und durch Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Das Protochlorophyllid hatte bei der Anregungswellenlänge von 433 nm ein Fluoreszenzmaximum bei 624 nm. Nach Weißlichtbestrahlung der Keimlinge und der Umwandlung von Protochlorophyllid zu Chlorophyll verschob sich dieses Maximum auf 663 nm. Der Versuch wurde zunächst mit der *pif1-2*-

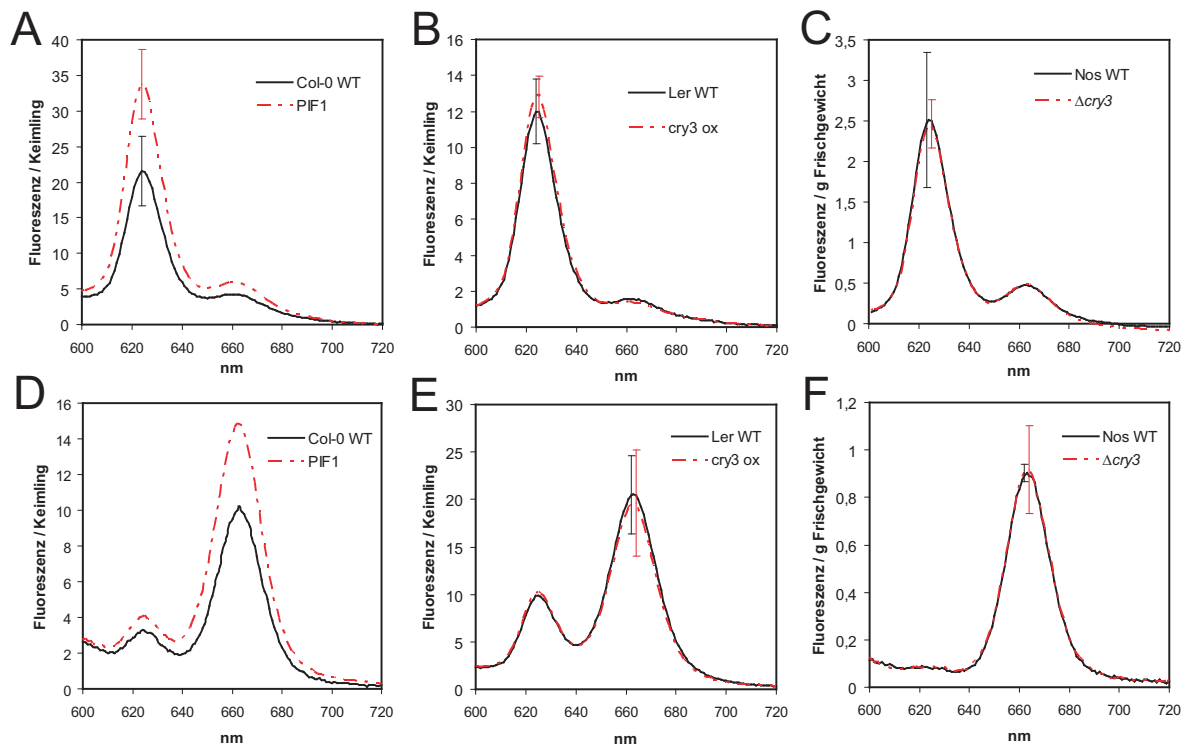


Abbildung 21: Protochlorophyllid- und Chlorophyll-Analyse durch Fluoreszenzspektroskopie. Die Pigmente von 4 Tage alten etiolierten Keimlingen wurden in 1 ml DMF extrahiert. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Excitationswellenlänge von 433 nm aufgenommen. (A-C) Spektren der Protochlorophyllid-Fluoreszenz von etiolierten Keimlingen der *pif1* Mutante, *cry3ox*-Linie und $\Delta cry3$ -Mutante im Vergleich zu dem entsprechenden WT. (D-F) Spektren der Chlorophyll-Fluoreszenz von etiolierten Pflanzen nach 1 h WL-Bestrahlung.

Mutante durchgeführt, wobei der erhöhte Protochlorophyllid-Gehalt in der Mutante bestätigt werden konnte (Abbildung 21 A). Auch der Chlorophyll-Gehalt nach WL-Bestrahlung war in der *pif1*-Mutante im Vergleich zum WT erhöht (Abbildung 21 D). Wie in Abbildung 21 B und E gezeigt, unterschied sich dagegen die *cry3*-Überexpressionslinie vom entsprechenden WT weder im Protochlorophyllid-Gehalt, noch im Chlorophyllgehalt. Um die Pigmentgehalte der $\Delta cry3$ -Mutante mit dem Nossen-WT vergleichen zu können, wurde die relative Fluoreszenz nicht wie zuvor auf die Anzahl der Keimlinge bezogen, sondern auf das eingesetzte Frischgewicht. Aufgrund einer verzögerten Keimung, die in Abschnitt 3.3.4 genauer beschrieben ist, waren die etiolierten Keimlinge der *cry3*-Mutante nach 4 Tagen Wachstum kleiner als die Nossen-WT-Keimlinge. Bezogen auf das Frischgewicht, das zur Pigmentextraktion eingesetzt wurde, war auch der Pigmentgehalt der *cry3-knock-out*-Linie im Vergleich zum WT nicht verändert (Abbildung 21 C und F).

Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen von Mesophyllzellen aus WT- und *cry3ox*-Pflanzen deuteten auf eine vermehrte Bildung von Grana-Thylakoid-Stapeln in der Überexpressionslinie hin. Diese Ergebnisse konnten jedoch durch weitere mikroskopische Untersuchungen nicht bestätigt werden. Da die relative Menge der Grana-Stapel auch das Chlorophyll A/B Verhältnis beeinflusst, wurde im folgenden Versuch das Chlorophyll A/B-Verhältnis

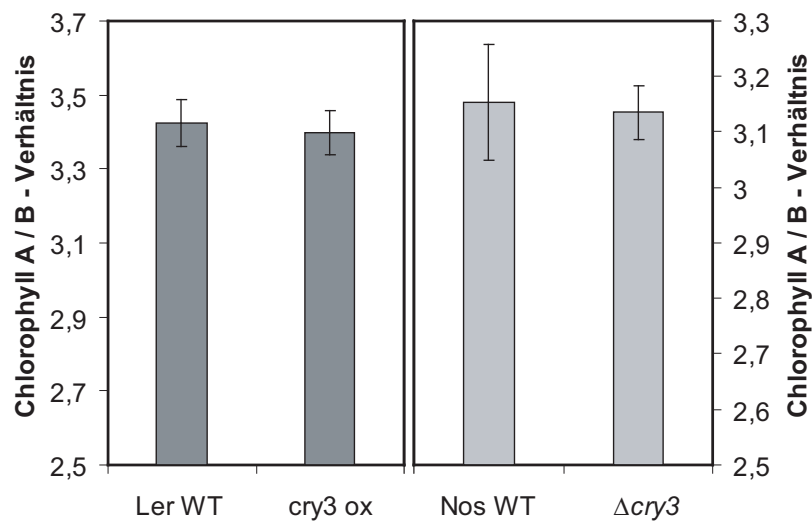


Abbildung 22: Chlorophyll A/B Verhältnis. Das Chlorophyll A/B-Verhältnis der cry3ox-Linie sowie der $\Delta cry3$ -Mutante mit den entsprechenden WT-Kontrollen wurde nach Absorptionsspektroskopie berechnet.

der cry3ox-Linie und der $\Delta cry3$ -Mutante mit dem jeweiligen WT verglichen. Dazu wurden die Pigmente aus Blättern ergrünter *Arabidopsis* Keimlinge in DMF extrahiert und durch Absorptionsspektroskopie untersucht. Anhand dieser Spektren wurden schließlich die Chlorophyll A- und Chlorophyll B-Gehalte bestimmt. Wie in Abbildung 22 dargestellt, weisen weder die cry3ox-Linie noch die $\Delta cry3$ -Mutante ein unterschiedliches Pigmentverhältnis im Vergleich zum WT auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch die zunächst beobachtete Veränderung der Stapelung der Thylakoide in der cry3-ox Linie nicht durch cry3 verursacht wurde.

3.3.3 Untersuchungen zur Regulation von Plastidengen durch cry3

Eine *microarray* Analyse von Brudler et al. (2003) deutete bereits auf eine Beteiligung des *Synechocystis* cryDASH an der Regulation einiger Gene hin. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch für *Arabidopsis* cry3 eine entsprechende regulatorische Funktion nachgewiesen werden kann. Aufgrund der cry3-Lokalisation in den Chloroplasten wurde insbesondere die Genregulation von plastidenkodierten Genen untersucht. Dabei wurde nach lichtgesteuerten Prozessen in den Plastiden gesucht, bei denen cry3 als Blau-/UV- Photorezeptor eine Rolle spielen könnte.

Um zu überprüfen, ob cry3 an der von Chun et al. (2001) beschriebenen Blau-/UV-A-abhängigen Induktion der Transkription in Chloroplasten beteiligt ist, wurden 2 Wochen alte *Arabi-*

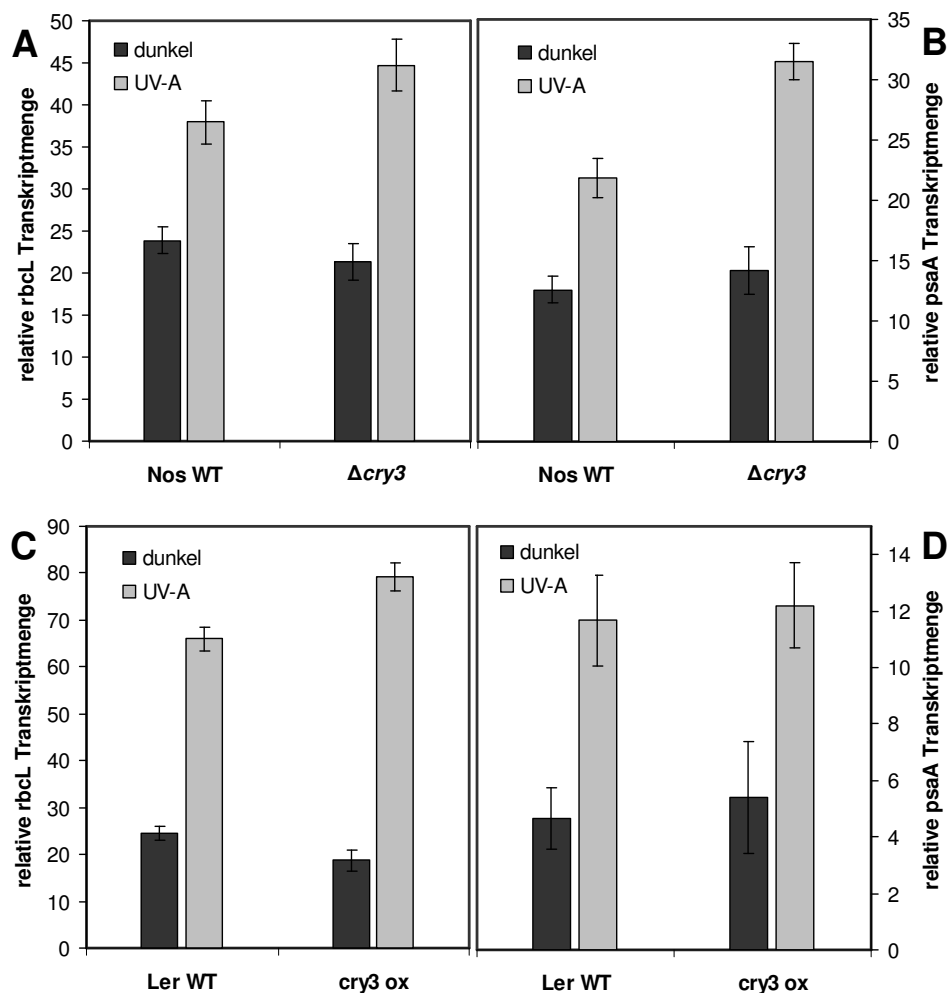


Abbildung 23: Induktion der Plastidentranskripte durch UV-A. Zwei Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden für 2 Tage dunkeladaptiert. Nach 13 h UV-A-Bestrahlung (λ_{max} 360 nm, $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurden die relativen Transkriptmengen von rbcL und psaA mit der Dunkelkontrolle verglichen. Die Transkriptmengen wurden durch *realtime* PCR mit UBQ10 als Referenzgen quantifiziert. Die dunklen Balken repräsentieren die Dunkelkontrollen, die hellen Balken zeigen die UV-A-behandelten Proben. (A) Transkript-Induktion von rbcL im Nos-WT und der Δcry3 Mutante. (B) psaA Transkript-Induktion in der Δcry3 -Mutante verglichen mit dem Nos-WT. (C) rbcL Transkript-Induktion in Ler WT und cry3ox Linie. (D) Transkript-Induktion von psaA in Ler WT und cry3ox Linie.

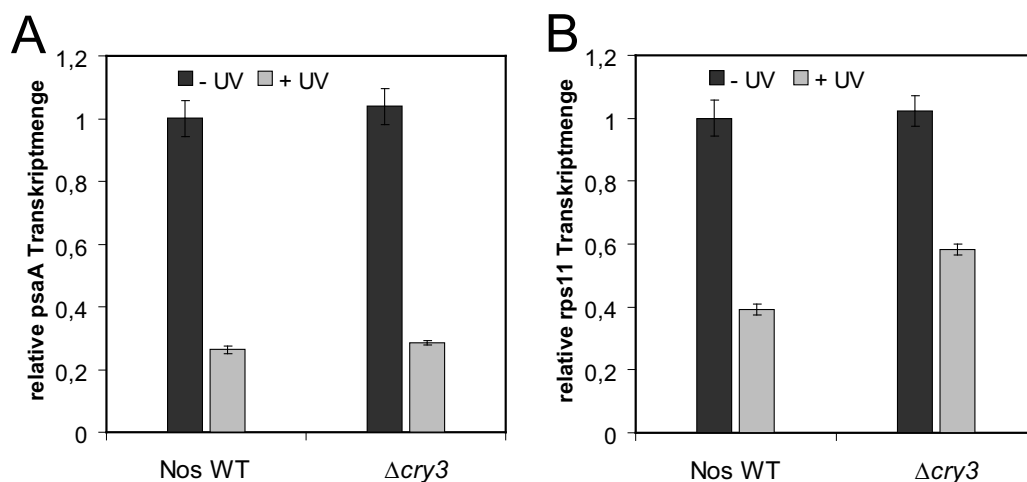


Abbildung 24: UV-B-induzierter Abbau von Plastidentranskripten. 11 Tage alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden für 15 Minuten mit UV-B bestrahlt oder blieben als Kontrolle im Weißlicht. Die relativen Transkriptmengen von *psaA* und *rps11* wurden durch *realtime* PCR mit UBQ10 als Referenzgen quantifiziert. Der UV-B induzierte Abbau von *psaA*-Transkripten (A) und *rps11*-Transkripten (B) in $\Delta cry3$ -Mutanten wurde mit Nos-WT-Pflanzen verglichen.

dopsis Pflanzen für 2 Tage dunkeladaptiert und anschließend zur Transkript-Induktion für 13 h mit UV-A bestrahlt. Anschließend wurde die relative *rbcl*- und *psaA*-Transkriptmenge im Vergleich zu unbestrahlten Pflanzen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Induktion der *rbcl*- und *psaA*-Transkripte bei der $\Delta cry3$ -Mutante wies keinen signifikanten Unterschied zum WT auf (Abbildung 23 A und B). Nach 13 h UV-A Bestrahlung hatte sich die Transkriptmenge etwa verdoppelt. Auch die *cry3*-Überexpressionslinie zeigte weder bei der *rbcl*-Regulation (Abbildung 23 C), noch bei der *psaA*-Regulation (Abbildung 23 D) eine Veränderung im Vergleich zum entsprechenden WT. An dieser Blau-/UV-A abhängigen Transkript-Induktion in *Arabidopsis thaliana* ist *cry3* demnach nicht beteiligt.

Eine weitere mögliche Beteiligung von *cry3* an der Regulation von Plastidentranskripten ergab sich aus der Analyse der von Ulm et al. (2004) veröffentlichten *microarray* Daten. Bei dieser Analyse wurden Veränderungen der Genexpression untersucht, die durch UV-B-Bestrahlung induziert werden. Die Auswertung der *microarray* Daten ergab, dass plastidenkodierte Transkripte durch die verwendete UV-B-Bestrahlung deutlich herunterreguliert werden. In den folgenden Experimenten wurde daher getestet, ob *cry3* bei dieser Regulation möglicherweise als UV-B-Rezeptor wirkt. Im Weißlicht angezogene *Arabidopsis* Keimlinge wurden dazu für 15 min mit UV-B bestrahlt, während die Kontrollpflanzen weiter im WL blieben. Nach weiteren 6 h im Weißlicht wurden die plastidären Transkriptmengen der Pflanzen durch *realtime* PCR quantifiziert. Wie in Abbildung 24 A gezeigt, wurden die *psaA*-Transkripte im Nos-WT nach der UV-B-Behandlung um ca. 70% reduziert. Aber auch in der $\Delta cry3$ -Mutante erfolgt diese UV-B-abhängige Regulation ebenso wie im WT. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte die Analyse der *rps11*-Transkripte (Abbildung 24 B). Obwohl in diesem Fall der Transkriptabbau in der Mutante etwas geringer war als im WT, wurden auch hier die Transkripte in Abwesenheit von

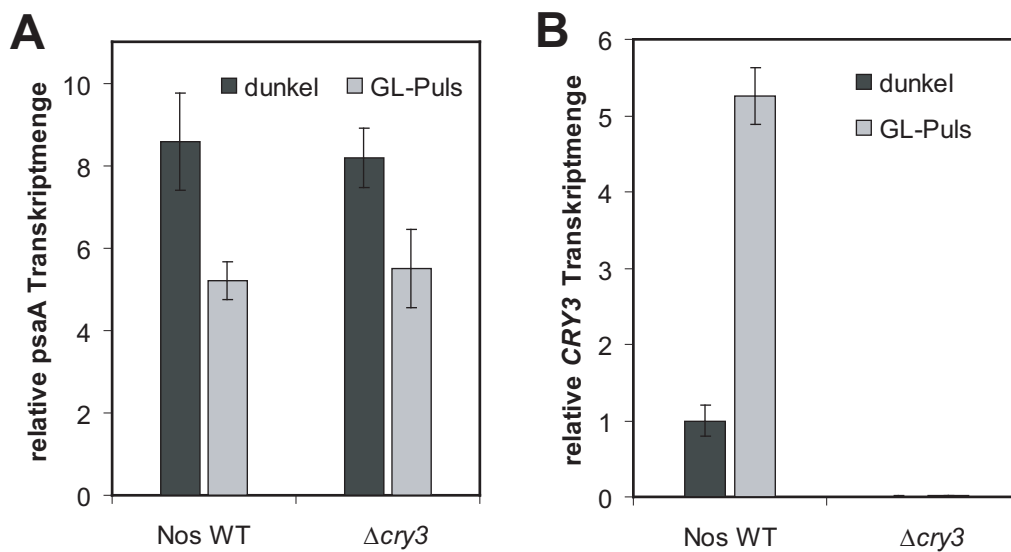


Abbildung 25: Grünlichtabhängiger Transkriptabbau in Chloroplasten. 4 Tage alte etiierte *Arabidopsis* Keimlinge wurden mit einem Grünlicht-Puls (526 nm) von $100 \mu\text{mol m}^{-2}$ bestrahlt. Nach 1 h im Dunkeln wurden die Transkriptmengen von *psaA* und *CRY3* durch *realtime* PCR mit UBQ10 als Referenzgen bestimmt. (A) Relative *psaA*-Transkriptmenge im Dunkeln und nach einem GL-Puls bei Nossen-WT und $\Delta cry3$ -Pflanzen. Die Fehlerbalken zeigen den Standard-Fehler aus 7 unabhängigen Experimenten. (B) Die *CRY3*-Transkriptmenge von etiierten Keimlingen ohne und mit GL-Bestrahlung wurde durch *realtime* PCR bestimmt.

funktionellem *cry3* herunterreguliert. An dieser UV-B-vermittelten Genregulation ist *cry3* somit nicht beteiligt.

Auch Grünlicht hat einen regulatorischen Einfluss auf das plastidäre Transkriptom, wie von Dhingra et al. (2006) nachgewiesen wurde. Da der verantwortliche Photorezeptor für diese Reaktion bisher allerdings noch nicht identifiziert werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese grünlichtabhängige Regulation in den Chloroplasten durch Cryptochrom 3 vermittelt wird. Dazu wurden etiierte Keimlinge nach 4 Tagen im Dunkeln für 15 s mit einem Grünlichtpuls mit einer Wellenlänge von 526 nm und einem Photonenfluss von $6,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt. Die relativen Transkriptmengen wurden nach einer weiteren Stunde im Dunkeln durch *realtime* PCR bestimmt. Ähnlich wie bei der *CRY3*-Transkript-Induktion durch Dunkelrot (Abschnitt 3.2.1), konnte *CRY3* bereits durch diesen kurzen Grünlicht-Puls um das 5-fache induziert werden (Abbildung 25 B). Für die Untersuchung des Transkriptabbaus nach Grünlichtbestrahlung wurden verschiedene plastidäre Gene wie *psaA*, *psbD*, *rbcL*, 16s rRNA oder *rps11* mit UBQ10 als Referenzgen analysiert. Die Quantifizierung der Plastidentranskripte aus etiierten Keimlingen wies jedoch eine recht hohe Variabilität auf, was zusammen mit dem relativ geringen erwarteten Transkriptabbau die Analyse deutlich erschwerte. Daher wurde schließlich nur das *psaA*-Gen eingehend auf den grünlichtabhängigen Abbau hin untersucht. In Abbildung 25 A ist das Ergebnis dieser Analyse mit den Mittelwerten aus 7 unabhängigen Versuchen nach *realtime* PCR-Analysen mit 3-fach Bestimmung gezeigt. Im Nos-WT erfolgte nach Grünlicht-Bestrahlung eine ca. 40%ige Reduktion der *psaA*-Transkripte. Aber auch in etiiert-

ten Keimlingen der $\Delta cry3$ -Mutante war diese Regulation der *psaA*-Transkripte nachzuweisen und unterschied sich dabei nicht von der Regulation in WT-Keimlingen. Somit lässt sich anhand dieser Ergebnisse auch für den Prozess des grünlichtregulierten Transkript-Abbaus in Plastiden Cryptochrom 3 als Photorezeptor ausschließen.

3.3.4 Keimung

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob *cry3* in *Arabidopsis thaliana* einen Einfluss auf die Samenkeimung hat. Die Samenkeimung wird von vielen Faktoren beeinflusst, darunter abiotische Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit, Licht oder der Nitratgehalt der Erde. Auch die unterschiedliche genetische Ausstattung verschiedener *Arabidopsis* Ökotypen hat einen Einfluss auf die Keimungsfähigkeit (Koornneef et al., 2002). Ebenso verändert sich die Fähigkeit der Samen zur Keimung mit der Zeit während der weiteren Samenreife (Penfield et al., 2005). Somit kann auch die Dauer und die Art der Lagerung der Samen diesen Prozess beeinflussen. Zusätzlich kann die Keimungsfähigkeit der Samen von den Wachstumsbedingungen der Mutterpflanzen während der Samenbildung abhängen. Für die Keimungsexperimente mit *Arabidopsis* war es daher wichtig, den passenden Ökotyp für jede Mutante als WT-Kontrolle zu verwenden. Zudem wurden die Mutterpflanzen alle zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen zur Samenproduktion angezogen und die Samen nach der Ernte unter identischen Bedingungen gelagert.

Die Keimung der *cry3*-Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen im Weißlicht zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Kontrollen. Auch bei der $\Delta cry3$ -Linie waren 3-4 Tage nach der Aussaat alle Samen gekeimt. Daher wurde die Keimung schließlich unter deutlich limitierenden Lichtbedingungen analysiert. Dazu wurden Bedingungen gewählt, bei denen auch die WT-Samen nach 4 Tagen keine vollständige Keimung zeigten. Die Keimung der Samen erfolgte entweder nach 5 min Hellrotbestrahlung im Dunkeln, im Dauer-Dunkelrotlicht oder im Dauerblaulicht. Die Ergebnisse dieser Keimungsversuche sind in Abbildung 26 zusammengefasst. Bei der Analyse der $\Delta cry3$ -Mutante wurde zunächst unter allen untersuchten Bedingungen ein signifikanter Unterschied in der Keimung dieser Linie im Vergleich zum WT festgestellt. Da von Fedoroff und Smith (1993) für die $\Delta cry3$ -Transposon-Linie der Nossen-Ökotyp als Hintergrund angegeben worden war, wurde der Nossen-WT als Kontrolle verwendet. Bei der $\Delta cry3$ -Mutante waren nach 5 min Hellrot-Bestrahlung etwa 50% weniger Samen gekeimt als bei der Nossen-WT-Kontrolle (Abbildung 26 A). Unter Dauer-Dunkelrot- und Dauer-Blau-Bedingungen war die Keimungsfähigkeit der Mutante sogar um 90% bzw. 80% reduziert (Abbildung 26 B und C). Um die Keimung der $\Delta cry3$ -Mutante und des Nos-Wildtyps unter Hellrot-Bedingungen eingehender zu untersuchen, wurde eine *fluence response* Kurve erstellt (Abbildung 26 D). Dabei wurden die Samen mit einer steigenden Dosis an monochromatischem Rotlicht (662 nm) bestrahlt und die entsprechenden Keimungsraten wurden bestimmt. Erst ab einer Rotlicht-Fluenz von mehr als $10^7 \mu\text{mol m}^{-2}$ entsprach der Anteil der

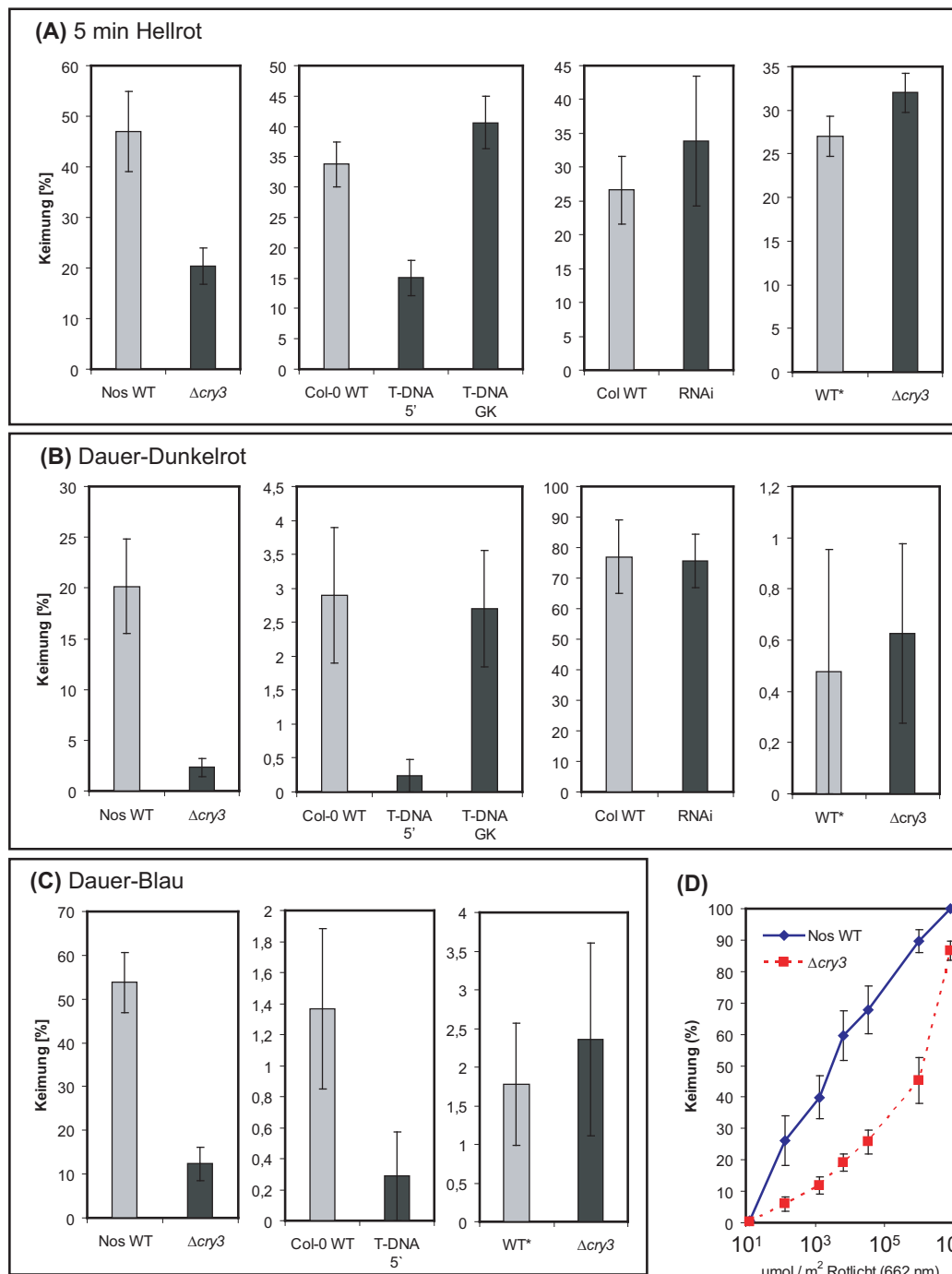


Abbildung 26: Keimung verschiedener *cry3*-Linien. Die Keimung der Samen wurde nach 3 Tagen Stratifikation mit den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen induziert. Der Anteil der gekeimten Samen wurde nach 4 Tagen bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardfehler aus jeweils 6 unabhängigen Versuchen dar. Die $\Delta cry3$ -Linie, 2 T-DNA-Linien und die RNAi-Linie wurden mit den entsprechenden WT-Linien verglichen. Die 5' T-DNA Linie hat eine Insertion im *CRY3*-Promotorbereich, bei der T-DNA-GK (Gabi-Kat) Linie sind die letzten 40 Aminosäuren von *cry3* deletiert. WT* wurde aus einer heterozygoten $\Delta cry3$ -Linie selektiert. (A) Keimungsinduktion durch 5 min HR-Licht ($\lambda[\text{max}]$ 656 nm, $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Keimung erfolgte anschließend für 4 Tage im Dunkeln. (B) Keimung der Samen nach 4 Tagen Dauer-Dunkelrot ($\lambda[\text{max}]$ 730 nm, $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (C) Keimung nach 4 Tagen Dauer-Blau ($\lambda[\text{max}]$ 436 nm, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (D) Fluence response Kurve der Keimung von Nos-WT und $\Delta cry3$ bei zunehmender HR-Lichtintensität.

gekeimten Samen in der Mutante dem beim Nos-WT.

Das Riken-BioResource-Center, von dem die $\Delta cry3$ -Linie bezogen wurde, berichtet von einigen Polymorphismen zwischen der Nossen WT-Linie und der Parentallinie von Fedoroff und Smith (1993), die für die Mutagenese verwendet wurde. Daher wurde diese Parentallinie Ds6-393-19 vom NASC (N8529) bezogen, um die Keimung dieser Linie mit der Mutante zu vergleichen. Auch unter optimalen Keimungsbedingungen im Weißlicht konnte von dieser Linie nur ein sehr geringer Teil der Samen zur Keimung gebracht werden. Unter den ansonsten verwendeten Test-Bedingungen keimten diese Samen gar nicht (Abbildung 42 im Anhang). Da die $\Delta cry3$ -Transposonlinie vom Riken-Institut heterozygot für die Insertion war, konnten durch Selektion geeignete WT-Kontrollpflanzen für die Keimungsversuche erzeugt werden, die somit keine Insertion im CRY3 Gen hatten. Diese Selektion durch PCR ist bereits in Abschnitt 3.3.1 für die *cry3-knock-out*-Mutante beschrieben worden. Im Vergleich zu diesen WT-Pflanzen mit funktionellem *cry3* (als WT* bezeichnet) war schließlich kein signifikanter Unterschied zu der $\Delta cry3$ -Linie mehr festzustellen (Abbildung 26 A-C).

Auch die Keimung anderer *CRY3*-Linien wurde unter den beschriebenen Bedingungen getestet. Weder die *CRY3*-RNAi-Linie, noch die GK-T-DNA-Linie mit einem verkürzten *cry3* C-Terminus wiesen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Linien eine verringerte Keimungsfähigkeit auf. Die 5' T-DNA-Linie mit der Insertion im *CRY3*-Promotorbereich zeigt dagegen einen deutlichen Keimungsphänotyp, ähnlich wie bei der *cry3-knock-out*-Linie im Vergleich zum Nossen-WT. 4 Tage nach dem 5-minütigen HR-Puls betrug die Keimungsrate bei dieser T-DNA-Linie weniger als 50% im Vergleich zum Col-0-WT (Abbildung 26 A). Unter Dauer-Dunkelrotbestrahlung sank die Keimungsrate von etwa 3% im WT auf unter 0,3% in der Mutante (Abbildung 26 B) und im Dauer-Blaulicht keimten nicht 1,4% der Samen wie beim WT, sondern nur ca. 0,3%. Alle diese Unterschiede in der Keimungsfähigkeit der 5' T-DNA-Mutante im Vergleich zum Col-0-WT waren hoch signifikant mit einem maximalen Wert beim *student's t*-test von 0,05.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 für etiolierte Keimlinge gezeigt wurde, wird die *CRY3*-Expression Phytochrom-abhängig durch Licht reguliert. Diese Art der Expressions-Induktion durch Phytochrom könnte auch bei einer möglichen Beteiligung von *cry3* an der Regulation von Keimungsprozessen eine Rolle spielen. Daher wurde hier untersucht, ob die *CRY3*-Transkript-

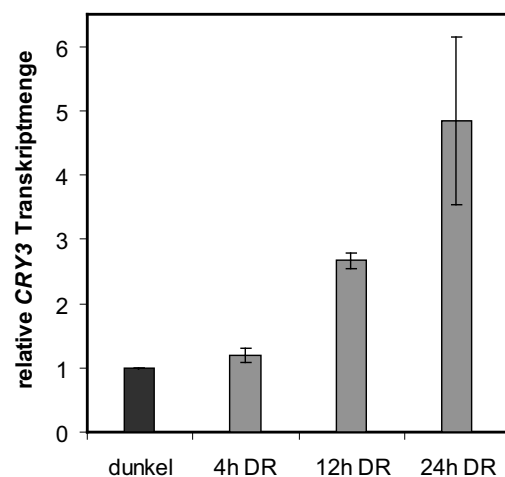


Abbildung 27: DR-Induktion von *CRY3* in Samen. Col-WT Samen wurden nach 1 h Quellung für 4 min mit 750 nm ($11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Nach 3 Tagen Stratifikation im Dunkeln wurden die Samen mit DR ($\lambda[\text{max}]$ 730 nm, $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Die *CRY3* Transkriptmengen in den Samen wurden durch realtime PCR mit SAND (At2g28390) als Referenzgen bestimmt.

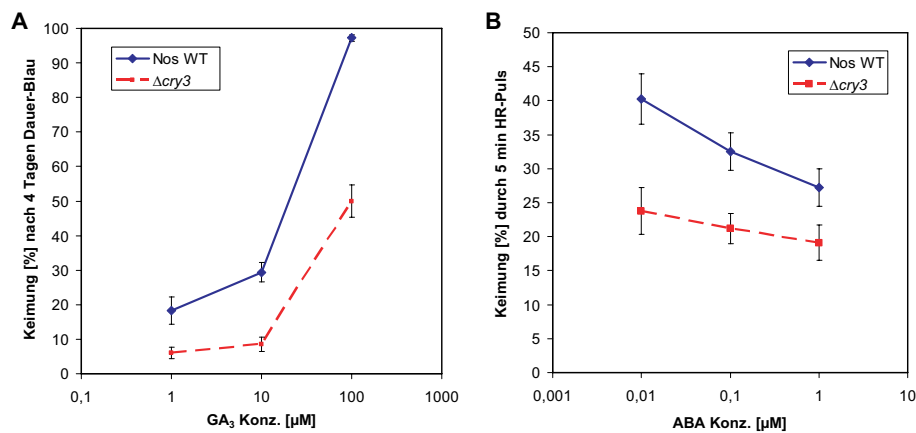


Abbildung 28: Einfluss der Phytohormone GA und ABA auf die Keimung von Nos-WT und $\Delta cry3$. (A) Die Samenkeimung wurde nach 4 Tagen Dauer-Blau ($\lambda[\text{max}]$ 436 nm, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei steigender Gibberellinkonzentration im Medium bestimmt. (B) Die Keimungsraten nach einem 5-minütigem HR-Puls ($\lambda[\text{max}]$ 656 nm, $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 4 Tagen im Dunkeln wurden in Abhängigkeit von der Abscisinsäurekonzentration bestimmt.

Induktion durch Dunkelrotlicht bereits in den Samen von *Arabidopsis thaliana* nachzuweisen ist. Für den in Abbildung 27 dargestellten Versuch wurden daher die Samen des Columbia-Ökotyps wie bei den vorangegangenen Keimungsversuchen nach der Aussaat mit einem DR-Puls behandelt und nach 3 Tagen Stratifikation für die entsprechende Zeit mit DR bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die RNA direkt aus den Samen isoliert und die relative *CRY3*-Transkriptmenge durch *realtime* PCR bestimmt. Bereits in den Samen von *Arabidopsis thaliana* konnte ein DR-induzierter Anstieg von *CRY3*-Transkripten nachgewiesen werden. Nach 24 h DR-Bestrahlung war die *CRY3*-Transkriptmenge um bis zu 5-fach erhöht. Im Gegensatz zu der transienten Induktion in etiolierten Keimlingen, die bereits nach 4 h ihr Maximum erreichte, war die Lichtantwort in den Samen allerdings um mindestens 20 h verzögert.

Auf der Suche nach den Ursachen für die verringerte Keimungsfähigkeit der *cry3*-Mutante im Vergleich zum Nossen-WT wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss der Phytohormone Gibberellin (GA) und Abscisinsäure (ABA) auf die Samenkeimung untersucht. Bei WT-Pflanzen wird die Samenkeimung durch Gibberellin stimuliert, durch Zugabe von Abscisinsäure dagegen inhibiert (siehe Einleitung). Diese beiden antagonistischen Hormone sind an der Regulation der Keimung beteiligt. Die Keimung von Nossen-WT- und $\Delta cry3$ -Samen wurde bei Zugabe von jeweils 1 μM , 10 μM und 100 μM GA₃ im Medium nach 4 Tagen Dauer-Blaulicht-Bestrahlung untersucht (Abbildung 28 A). Bei Erhöhung der Gibberellinkonzentration im Wachstumsmedium stieg die Keimungsrate bei den Nos-WT-Samen stark an, so dass bei Zugabe von 100 μM GA eine vollständige Keimung aller Samen erreicht wurde. Die Samen der $\Delta cry3$ -Mutante keimten zwar bei 100 μM Gibberellinzugabe nur zu 50%, dennoch konnte auch bei dieser Linie die Keimung durch Gibberellin stark erhöht werden. Die Erhöhung der ABA-Konzentration im Wachstumsmedium, welche beim WT zu einer deutlichen Reduktion der Keimungsrate nach einem 5-minütigem HR-Puls führte, hatte auch in der $\Delta cry3$ -Mutante

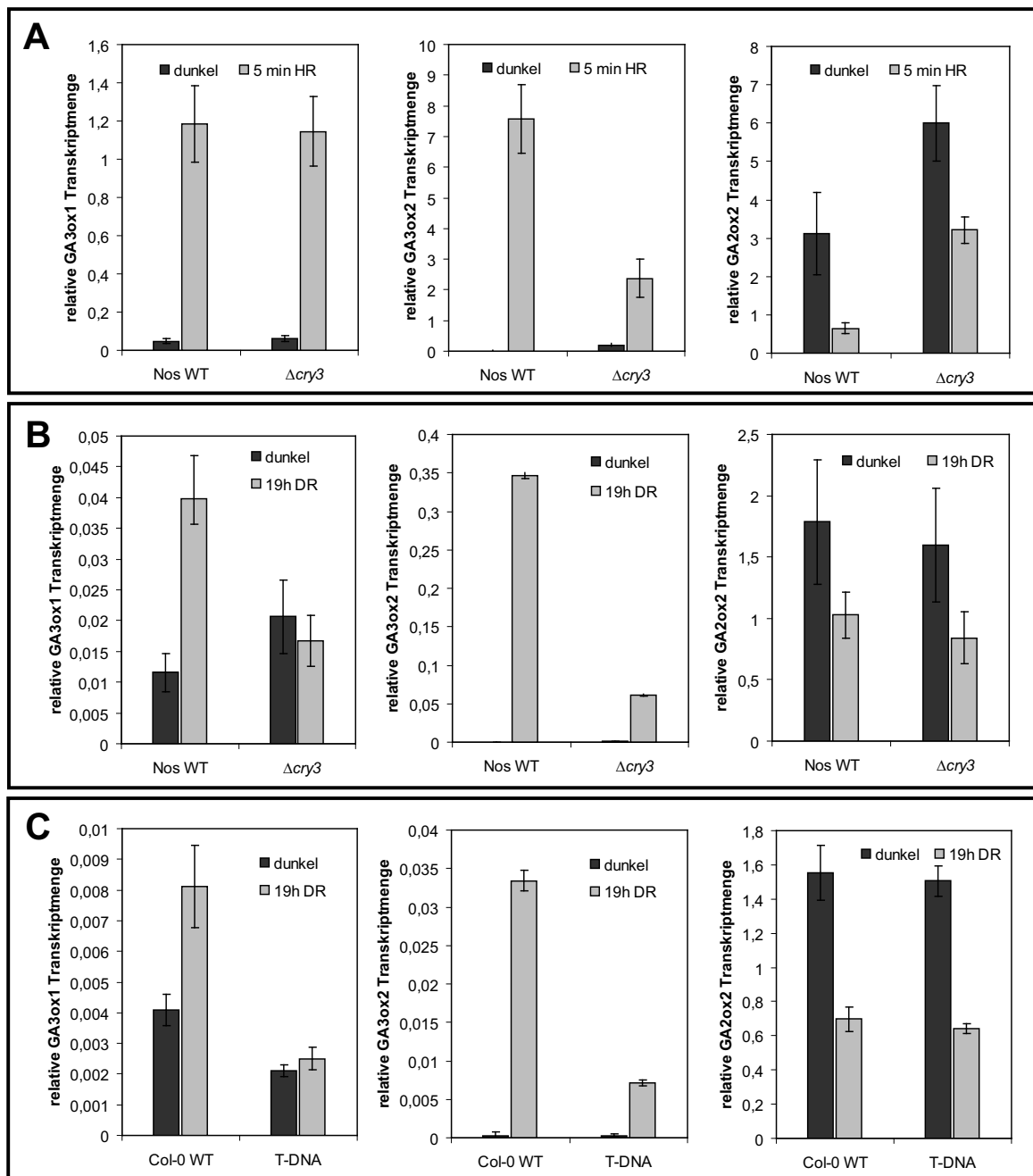


Abbildung 29: Einfluss von *cry3* auf die Regulation der Gibberellin-Oxidasen. Die GA3ox1-, GA3ox2- und GA2ox2-Transkriptmengen in den Samen von $\Delta cry3$, 5' T-DNA-Linie und WT wurden durch *realtime* PCR bestimmt. Als Referenzgene wurden PPR (At1g62930) und SAND (At2g28390) verwendet. (A) Transkriptmengen von WT und $\Delta cry3$ Samen nach 5 min HR-Puls (λ [max] 656 nm, 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 18 h im Dunkeln im Vergleich zu den Dunkelkontrollen. (B) Die Transkriptmengen der GA-Oxidasen in WT- und $\Delta cry3$ -Samen wurden nach 19 h DR (λ [max] 730 nm, 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. in Dunkelheit bestimmt. (C) Die Transkriptmengen von GA3ox1, GA3ox2 und GA2ox2 in Col-WT und 5' T-DNA-Samen nach 19 h DR (λ [max] 730 nm, 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) im Vergleich zu den Dunkelkontrollen.

eine reduzierte Keimungsfähigkeit zur Folge. Die relative Reduktion der Keimungsrate in der Mutante fiel allerdings im Vergleich zum WT wesentlich geringer aus (Abbildung 28 B). Da die Keimungsfähigkeit der $\Delta cry3$ -Mutante unter diesen Bedingungen durch Gibberellin-Zugabe zumindest teilweise wiederhergestellt werden konnte, könnte die reduzierte Keimung der Mutante in einer veränderten Signaltransduktion durch Phytohormone oder in veränderten Konzentrationen dieser Phytohormone begründet zu sein. Daher wurde nachfolgend die Expression von Genen, die bei der Gibberellin-Synthese und -Abbau beteiligt sind, in der Mutante und dem WT verglichen. An den Regulationsprozessen, die zur lichtinduzierten Keimung bei *Arabidopsis* führen, ist die Expression der GA3 β -Hydroxylase-Gene in besonderem Maße beteiligt (Yamaguchi et al., 1998). Das Enzym GA3-Oxidase katalysiert den letzten Schritt der Gibberellin-Biosynthese. Das Enzym wird durch Gene einer kleinen Genfamilie kodiert, wobei die Gene GA3ox1 und GA3ox2 in Samen lichtabhängig reguliert werden. Die GA2-Oxidase, welche unter anderem durch GA2ox2 kodiert wird, ist dagegen am Gibberellin-Abbau beteiligt. Die Expression dieser Gene wurde unter keimungsfördernden Bedingungen sowohl in der $\Delta cry3$ -Mutante, als auch in der 5' T-DNA-Linie analysiert und mit der Expression in WT-Samen verglichen. Nach der RNA-Isolation aus den entsprechend bestrahlten Samen, erfolgte die Analyse der GA3ox- bzw. GA2ox-Expression durch *realtime* PCR. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 29 dargestellt. Als Kontrolle für die $\Delta cry3$ -Linie wurde hier der Nossen-WT verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die selektierte WT-Linie WT* noch nicht zur Verfügung stand. Nach einem 5-minütigen HR-Puls zur Keimungsinduktion wurden GA3ox1 und GA3ox2 in den Samen von Nossen-WT stark induziert. Während die Expression von GA3ox1 in der $\Delta cry3$ -Mutante nicht beeinträchtigt war, ist beim GA3ox2-Gen in der Mutante eine deutlich verminderte Induktion festzustellen (Abbildung 29 A). Auch die Expression von GA2ox2 ist in der Mutante beeinträchtigt. Beim WT ist eine eindeutige Reduktion der Transkriptmenge zu erkennen. Auch in der $\Delta cry3$ -Mutante war die Expression nach dem Rotlichtpuls reduziert, die GA2ox2-Transkriptmengen in der Mutante waren im Vergleich zum Nos-WT jedoch generell erhöht. Ein anderes Expressionsmuster dieser Gene konnte durch Bestrahlung der Samen mit Dauer-Dunkelrotlicht zur Keimungsinduktion beobachtet werden. Die Transkriptmengen wurden in diesem Fall nach 19 h DR-Bestrahlung bestimmt. Obwohl die GA3ox1-Expression im Nos-WT auch unter diesen Bedingungen induziert wird, zeigt die $\Delta cry3$ -Mutante keine induzierte Expression von GA3ox1 (Abbildung 29 B). Das GA3ox2-Gen wurde nach DR-Bestrahlung ebenso reguliert, wie zuvor beim HR-Puls. Auch hier ist die Induktion in der Mutante im Vergleich zum Nos-WT deutlich verringert. Lediglich die Expression des GA2ox2-Gens nach DR-Bestrahlung in der Mutante weist keinen Unterschied zur WT-Kontrolle auf (Abbildung 29 B). Die Regulation der GA-Oxidasen wurde auch in den Samen der 5' T-DNA-Linie bei Dauer-Dunkelrotbestrahlung überprüft, da die Keimungsfähigkeit dieser Linie, ebenso wie bei der $\Delta cry3$ -Mutante im Vergleich zum Nos-WT, unter diesen Bedingungen stark reduziert war. Für diese T-DNA-Insertionslinie konnte dabei das gleiche veränderte Regulationsmuster nachgewiesen werden, wie zuvor bei der *knock-out*-Mutante (Abbildung

29 C). Beim Col-WT wurde das GA3ox1-Gen nach der DR-Bestrahlung um 100% induziert, in der T-DNA-Linie wird dieses Gen dagegen überhaupt nicht reguliert. Die Induktion des GA3ox2-Gens beträgt bei der Mutante nur etwa $\frac{1}{5}$ der Induktion im WT. Die Transkriptmenge des GA2ox2-Gens in den Samen wird sowohl im WT, wie auch in der T-DNA-Mutante nach 19 h DR-Bestrahlung auf weniger als 50% reduziert. Somit konnte in beiden Mutanten-Linien mit einem veränderten Keimungsverhalten auch eine Veränderung in der Regulation der GA-Oxidase-Gene nachgewiesen werden. Die veränderte Genregulation in den Mutanten war jedoch ebenfalls von dem verwendeten Bestrahlungsprogramm abhängig.

3.3.5 Untersuchung auf eine mögliche Funktion als DNA-Photolyase

Entgegen der ursprünglichen Annahme, cry3 besitze keine Photolyaseaktivität (Kleine et al., 2003), konnte für cry3 später eine ssDNA-spezifische Photolyase-Aktivität demonstriert werden (Selby und Sancar, 2006; Pokorny et al., 2008). Durch diese neuen Erkenntnisse stellte sich im Laufe dieser Arbeit die Frage, ob sich für cry3 auch *in vivo* eine DNA-Photolyase-Aktivität nachweisen lässt und ob eine solche Aktivität möglicherweise auf die Organellen beschränkt ist. Da sich die Bildung von DNA-Schäden durch UV-B-Licht und deren Akkumulation stark auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen auswirkt, wurde daher zunächst das Wachstum von $\Delta cry3$ -Mutanten und cry3ox-Pflanzen unter erhöhter UV-B-Bestrahlung mit den WT-Pflanzen verglichen. Dazu wurden die Linien auf Erde angezogen, wobei die Pflanzen nach der 1. Woche jeden Tag zusätzlich für 5 min mit UV-B bestrahlt wurden. Zur Kontrolle wurden unter gleichen Bedingungen Pflanzen ohne zusätzliche UV-B-Bestrahlung angezogen. Außerdem wurde zur Kontrolle die Klasse II CPD-Photolyase-Mutante *uvr2-1* verwendet, die bei UV-B-Bestrahlung deutlich geschädigt wird. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 30 gezeigt. Bereits 24 Tage nach der Keimung war das Wachstum der UV-B-bestrahlten Nos-WT- und $\Delta cry3$ -Pflanzen im Vergleich zu den unbestrahlten Pflanzen sichtbar verringert. Ein deutlicher Unterschied im Wachstum war zwischen Nos-WT und der *cry3-knock-out*-Linie jedoch nicht zu beobachten. Ebenso unterschied sich die cry3-Überexpressionslinie cry3ox in Bezug auf die UV-B-Toleranz nicht vom Ler-WT. Die *uvr2-1*-Pflanzen ohne funktionelle CPD-Photolyase waren jedoch bereits nach 24 Tagen abgestorben (Abbildung 30 A). Auch nach weiteren 16 Tagen Wachstum unter erhöhter UV-B-Bestrahlung zeigten die $\Delta cry3$ -Mutante und die Überexpressionslinie keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zu den entsprechenden WT-Pflanzen (Abbildung 30 B).

Um den Einfluss von cry3 auf die Reparatur von DNA-Schäden *in planta* schließlich direkt zu bestimmen, wurde ein PCR-basierter Reparatur assay angewendet, bei dem die Schäden in genomischer, plastidärer und mitochondrialer DNA separat quantifiziert werden konnten. Dieser assay nutzt den Umstand, dass die Taq-Polymerase nicht in der Lage ist, *template*-DNA mit CPD-Schäden zu amplifizieren. Die Zunahme von DNA-Schäden durch UV-B-Bestrahlung konnte somit anhand einer geringeren Menge an amplifizierbarer DNA durch *realtime* PCR

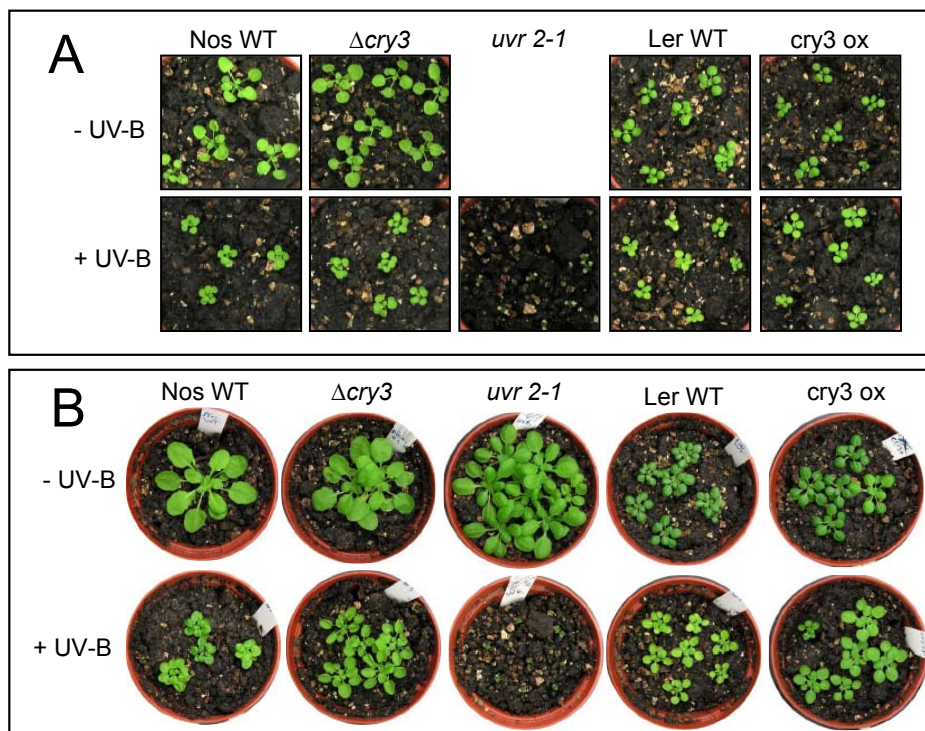


Abbildung 30: Wachstum von *Arabidopsis thaliana* bei zusätzlicher UV-B-Bestrahlung. Nos-WT, $\Delta cry3$, *uvr2-1*, Ler-WT und *cry3ox* wurden unter Weißlichtbedingungen mit (+ UV-B) und ohne (- UV-B) zusätzliche UV-B-Bestrahlung angezogen. UV-B-Licht wurde nach der 1. Woche täglich für 5 min zusätzlich zum WL eingestrahlt. (A) Gezeigt sind Pflanzen nach 24 Tagen und (B) Pflanzen nach 40 Tagen.

quantifiziert werden. Je höher der Anteil von DNA-Schäden also war, umso geringer wurde der ermittelte Ct-Wert, welcher durch die *realtime* PCR ermittelt wurde. Die amplifizierte DNA-Menge wurde schließlich noch auf die eingesetzte DNA *template* Menge bezogen, welche durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wurde. Anhand der amplifizierbaren DNA-Mengen in UV-bestrahlten und unbehandelten Pflanzen wurden, unter der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Schäden, durch Anwendung der Poisson-Verteilung die DNA-Schäden pro Kilobase berechnet. Da bei dieser Methode nur die Schäden in spezifischen DNA-Abschnitten bestimmt wurden, konnte durch die Verwendung von organellenspezifischen Primersequenzen auch die DNA-Reparatur in Mitochondrien und Chloroplasten untersucht werden, ohne diese zuvor aufzureinigen zu müssen. Um die Akkumulation von DNA-Schäden bei steigender UV-B-Bestrahlung zu quantifizieren, wurden Nos-WT-Pflanzen nach 14 Tagen Wachstum unter WL-Bedingungen für 5, 15, 30 oder 60 min mit Breitband-UV-B bestrahlt. Nach der Isolation der Gesamt-DNA wurde die Menge der DNA-Schäden in den Chloroplasten durch Amplifikation eines 1041 bp großen *psbD*-Fragmentes quantifiziert (Abbildung 31). Bis zu einer Bestrahlungsdauer von 15 min war ein linearer Anstieg der Schadenshäufigkeit festzustellen. Darüber hinaus wurde jedoch bei andauernder UV-B-Bestrahlung der weitere Anstieg der Schäden immer geringer. Dieser Effekt könnte durch verschiedene Anpassungsmechanismen der Pflanzen bei längerer Bestrahlungsdauer erklärt werden. Zudem könnte in den

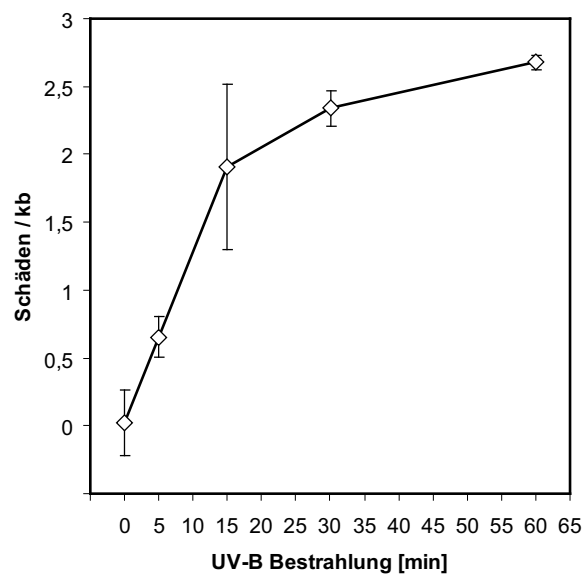


Abbildung 31: UV-B fluence response Kurve. Die Schadenshäufigkeit im psbD-Gen wurde durch den *realtime* PCR assay bei steigender UV-B-Bestrahlungsdauer bestimmt.

Pflanzen bereits während der Bestrahlung eine DNA-Reparatur stattfinden. Für die weiteren Versuche wurde daher eine Bestrahlungsdauer von 10 min gewählt, was einer UV-B-Fluenz von etwa 15 kJ m^{-2} entsprach. Die gleichmäßige Verteilung von DNA-Schäden in den Pflanzen ist eine wichtige Voraussetzung für die Quantifizierung der Schäden durch die Anwendung der Poisson-Verteilung. Eine solche gleichmäßige Verteilung der DNA-Schäden wurde von Chen et al. (1996) bereits in den Kotyledonen von *Arabidopsis* bestätigt. Die lineare Zunahme der Schäden bei geringer Bestrahlungsdauer (Abbildung 31) wie sie von Cannon et al. (1995) auch für Soja-Zellkultur gezeigt wurde, spricht dafür, dass die DNA-Läsionen in den verwendeten Pflanzen gleichmäßig verteilt waren.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von Cryptochrom 3 auf die Reparatur von DNA-Schäden in den unterschiedlichen Kompartimenten untersucht. Dazu wurden 14 Tage alte *Arabidopsis* Keimlinge zunächst für 10 min mit Breitband UV-B bestrahlt, um die Thymin-Dimere in der Pflanzen-DNA zu erzeugen. Anschließend wurden die Pflanzen mit Blaulicht bestrahlt, um so eine Photoreaktivierung der Schäden zu ermöglichen. Einige WT-Pflanzen wurden dagegen nach der Schadensinduktion zur Kontrolle der Photoreaktivierung dunkel gehalten. Zur Berechnung der Schadenshäufigkeit wurden Proben von Kontrollpflanzen ohne UV-B-Bestrahlung verwendet. Die verbleibende Schadenshäufigkeit wurde dann zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Schadensinduktion in einem Zeitraum von 24 h durch den *realtime* PCR assay quantifiziert. Zur Bestimmung der Schäden in der genomischen DNA wurde dazu ein 595 bp großes Fragment des GA3ox1-Gens amplifiziert. Zur Schadens-Quantifizierung in plastidärer und mitochondrialer DNA wurden jeweils Fragmente von *psaA* (713 bp) und *nad4* (692 bp) verwendet. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse aus jeweils mindestens 2 unabhängigen Versuchen gezeigt, wobei jede Quantifizierung durch *realtime*

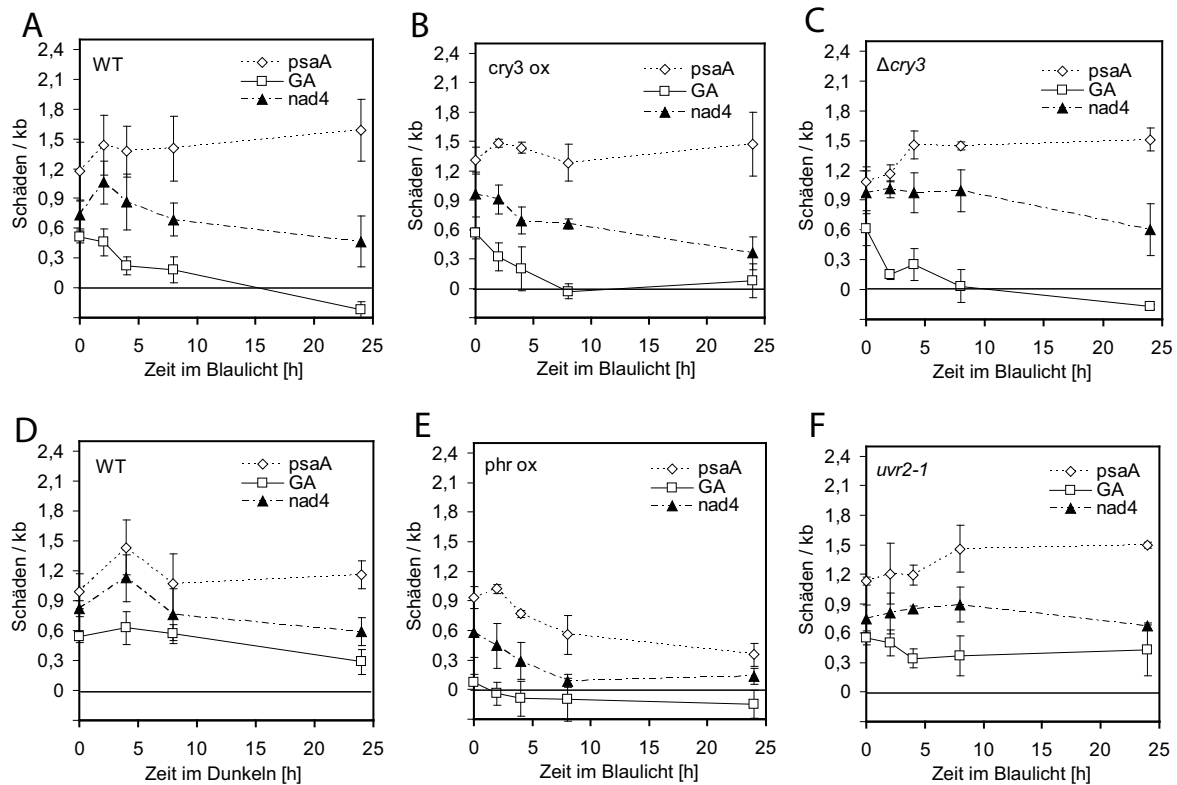


Abbildung 32: DNA-Reparatur assay. 2 Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen erhielten 10 min UV-B zur Induktion von DNA-Schäden. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Photoreaktivierung durch Blaulicht wurde die DNA extrahiert und zur Quantifizierung der verbliebenen Schäden durch *realtime* PCR verwendet. Die Schäden im nukleären, plastidären und mitochondrialen Genom wurden separat durch die jeweiligen repräsentativen Gene GA3ox1 (GA), *psaA* und *nad4* analysiert. (A) DNA-Reparatur in *Arabidopsis* WT-Pflanzen. (B) DNA-Reparatur in *cry3*-überexprimierenden Pflanzen. (C) DNA-Reparatur in den $\Delta cry3$ knock-out Mutanten. (D) DNA-Reparatur von WT-Pflanzen in Dunkelheit. Nach der UV-B-Behandlung wurden diese Pflanzen statt des photoreaktivierenden Lichts in Dunkelheit gehalten. (E) DNA-Reparatur in CPD-Photolyase-überexprimierenden Pflanzen. (F) DNA-Reparatur in der CPD-Photolyase-defizienten *uvr2-1*-Linie.

PCR als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Eine lichtabhängige Reparatur von genomischer DNA konnte in den WT-Pflanzen durch den verwendeten assay eindeutig nachgewiesen werden. Die DNA-Schäden des GA3ox1-Gens wurden nach 8 h Photoreaktivierung durch Blaulicht fast vollständig repariert (Abbildung 32 A). Im Dunkeln fand während dieser Zeit keine nachweisbare DNA-Reparatur statt und auch 24 h nach der UV-B-Behandlung waren die Schäden noch nicht vollständig repariert (Abbildung 32 D). Für die plastidäre DNA konnte während den 24 h Blaulichtbestrahlung dagegen keine Reparatur nachgewiesen werden. Bereits direkt im Anschluss an die UV-Bestrahlung war die Schadensdichte in den Chloroplasten höher als im Kern oder in den Mitochondrien (Abbildung 32 A). Für die mitochondriale DNA wurde eine geringe Schadensreparatur im Untersuchungszeitraum festgestellt. Nach 24 h Blaulichtbestrahlung der Pflanzen war die Schadensmenge um ca. 50% reduziert (Abbildung 32 A), aber auch in der Dunkelkontrolle erfolgte eine geringfügige Verringerung der Schäden der Mitochondrien-DNA (Abbildung 32 D). Bei der Untersuchung der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden in $\Delta cry3$ -Mutanten und *cry3ox*-Linien wurden im Vergleich zu

WT-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 32 B und C). In beiden Linien war die genomische DNA nach 8 h im Blaulicht vollständig repariert und eine Reparatur von plastidärer DNA war auch in diesen Linien nicht nachzuweisen. Obwohl die Anzahl der mitochondrialen DNA-Schäden in der *cry3ox*-Linie nach 24 h im Durchschnitt etwas geringer war, als in der $\Delta cry3$ -Linie, ist dieser Unterschied nicht als signifikant zu bewerten.

Die hohe Bedeutung der CPD-Photolyase in *Arabidopsis thaliana* als Reparaturenzym genomischer DNA konnte durch diese Versuche bestätigt werden. In der CPD-Photolyase-defizienten Mutante *uvr2-1* führte die Blaulichtbestrahlung auch nach 24 h noch zu keiner signifikanten Reparatur von genomischer DNA (Abbildung 32 F). In der genomischen DNA von CPD-Photolyase-überexprimierenden Pflanzen waren dagegen bereits direkt nach der UV-B-Bestrahlung kaum noch Schäden nachzuweisen (Abbildung 32 E). Die Expression der CPD-Photolyase beeinflusste nicht nur die Reparatur der DNA im Zellkern. Auch die Effizienz der Reparatur von DNA-Schäden in Chloroplasten und Mitochondrien konnte durch Überexpression der CPD-Photolyase deutlich gesteigert werden. So war die mitochondriale DNA in dieser Linie bereits nach 8 h fast vollständig repariert und die Schäden der plastidären DNA waren nach 24 h Blaulicht-Bestrahlung um mehr als 70% reduziert. Bei der *uvr2-1*-Mutante war dagegen in Chloroplasten und Mitochondrien keine Reparatur-Aktivität erkennbar (Abbildung 32 F).

Zusätzlich zu der Lokalisation von Cryptochrom 3 in den Chloroplasten und Mitochondrien, welche in dieser Arbeit nochmals bestätigt wurde, konnte in unserer Arbeitsgruppe durch GFP-Fusionen und Fraktionierungsversuche auch eine Kernlokalisation des Proteins nachgewiesen werden. Innerhalb des Zellkerns wurde das *cry3*-GFP-Fusionsprotein hauptsächlich im Nukleolus gefunden (J. Sommer, unpublizierte Daten). Diese Daten wurden auch durch Immunolokalisationsstudien in dieser Arbeit unterstützt (Abbildung 36 A). Da der Nukleolus als Syntheseort von ribosomaler RNA bekannt ist, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob Cryptochrom 3 möglicherweise an der spezifischen DNA-Reparatur von rRNA-Genen beteiligt sein könnte. Dazu wurden die Schäden des 25 S rRNA-Gens durch den

realtime PCR assay quantifiziert. Die Schwankungen zwischen den einzelnen unabhängigen Versuchsreihen waren bei der Analyse der rRNA-Gene höher als bei den zuvor verwendeten Genen. Möglicherweise erschwert die hohe Kopienzahl dieser ribosomalen DNA-Sequenzen pro Zelle eine exakte Quantifizierung durch *realtime* PCR. Dadurch weisen die Ergebnisse für

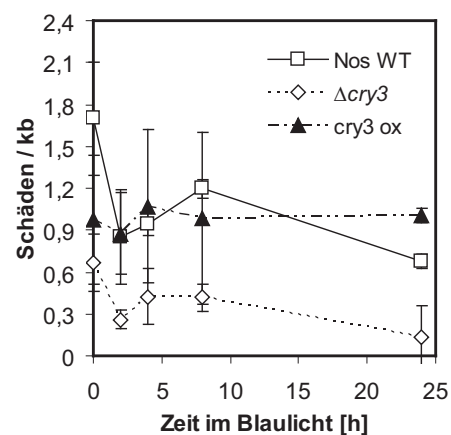


Abbildung 33: DNA-Reparatur der 25 S rRNA-Gene. Die Reparatur der rRNA-Gene wurde anhand des 25 S rRNA-Gens analysiert. DNA-Schäden in Nos-WT, $\Delta cry3$ und *cry3ox* wurden verglichen.

die rRNA-Gene eine höhere Ungenauigkeit auf. Es konnte gezeigt werden, dass die rRNA-Gene im Zellkern nicht so effizient repariert werden, wie andere genomische DNA-Abschnitte (Abbildung 33). Auch nach 24 h Photoreaktivierung im Blaulicht waren die 25 S rRNA-Gene noch nicht vollständig repariert. Obwohl die cry3-Überexpressionslinie keinen eindeutigen Unterschied zum WT aufwies, schien die Reparaturaktivität für ribosomale DNA in der $\Delta cry3$ -Mutante sogar erhöht. Dieser Befund ist konträr zu einer Photolyasfunktion von cry3 für die ribosomalen Gene.

4 Diskussion

4.1 Cryptochrom 3 ist in Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkernen lokalisiert

Mit Cryptochrom 3 wurde zusätzlich zu cry1 und cry2 ein drittes Cryptochrom in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Kleine et al., 2003). Eine N-terminale Signalsequenz stellt laut den Vorhersageprogrammen Predotar (Small et al., 2004) und TargetP (Emanuelsson et al., 2000) ein Transitpeptid dar, welches für den Transport von cry3 in Chloroplasten und Mitochondrien verantwortlich ist. Die Lokalisation in den Organellen wurde bereits durch Experimente mit GFP-Fusionen bestätigt (Kleine et al., 2003). Hierbei konnte eine Co-Lokalisation durch den Vergleich der cry3-GFP-Fluoreszenz und der Autofluoreszenz der Chloroplasten sowie der Fluoreszenz der Mitochondrien nach Färbung mit Mito-Tracker-Lösung gezeigt werden. Außerdem wurde der Import von *in vitro* translatiertem cry3 in isolierte Chloroplasten aus *Pisum sativum* nachgewiesen (Kleine et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten jetzt durch Fraktionierungs- und Immunlokalisationsstudien bestätigt werden. Dazu waren Mitochondrien und Chloroplasten aus *Arabidopsis* Zellkulturen isoliert und die Proteinextrakte dieser Fraktionen immunologisch untersucht worden. Die jeweilige Anreicherung von plastidären und mitochondrialen Proteinen ist durch die Antiseren gegen die Markerproteine CAB und DnaK eindeutig belegt. Während cry3 in den Protein-Gesamtextrakten aus der Zellkultur nicht detektiert werden konnte, zeigen die verwendeten cry3-Antikörper in den Chloroplasten und Mitochondrien ein deutliches Signal. Die Organellenlokalisation von cry3 konnte zunächst unter Verwendung eines affinitätsgereinigten cry3-Antikörpers bestätigt werden (Meier, 2004). Bezüglich der genauen Identität der Signale blieben jedoch noch einige Fragen offen, da nicht genau geklärt werden konnte, bei welchem der beiden nachgewiesenen Proteine im aufgereinigten Mitochondrienextrakt es sich um cry3 handelte (Abbildung 11 A). Erst mit dem neuen Antikörper konnte das kleinere Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 62,5 kDa eindeutig als cry3 identifiziert werden (Abbildung 11 B). Auch das cry3-Signal in den Chloroplasten konnte erst mit dem neuen Antikörper SA4288 eindeutig bestätigt werden, da bereits das Präimmuns serum des zuvor verwendeten Antikörpers eine starke Bande dieser Größe detektierte. Eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein konnte daher zunächst nicht ausgeschlossen werden. Da cry3 schließlich durch zwei unabhängige Antikörper in Extrakten aus Chloroplasten und Mitochondrien, aber nicht in Proteingesamtextrakten nachgewiesen werden konnte, ist eine Fehlinterpretation dieser Ergebnisse durch Kreuzreaktionen im *Western-blot* sehr unwahrscheinlich. Die Untersuchungen durch Zellfraktionierung und anschließender immunologischer Detektion bestätigen also die Lokalisation von Cryptochrom 3 in den Chloroplasten und Mitochondrien.

Die Lokalisation von cry3 wurde außerdem durch Immunogoldstudien überprüft. Das Ziel dabei war unter anderem, durch eine spezifische Lokalisation innerhalb der Organellen einen

Hinweis auf die Funktion von Cryptochrom 3 zu erhalten. Cry3 konnte sowohl in Chloroplasten, als auch teilweise in Mitochondrien detektiert werden (Abbildungen 11 E-F und 36). Eine Negativ-Kontrolle zu diesen Versuchen konnte allerdings nicht durchgeführt werden, da die *cry3-knock-out*-Mutante zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand. Auch eine Kontrolle mit dem Präimmunserum wurde nicht durchgeführt, da für diese Versuche ein affinitätsgereinigter cry3-Antikörper verwendet worden war. Mögliche Kreuzreaktionen des Präimmunserums hätten daher keine zusätzlichen Aussagen über die Spezifität des verwendeten Antikörpers ermöglicht. Aufgrund der Verteilung der Goldpartikel auf den Schnitten kann man jedoch auf eine hohe Spezifität des Antikörpers schließen. Goldpartikel waren fast ausschließlich in den Organellen und kaum in anderen Bereichen wie Cytoplasma oder Vakuolen zu finden. Auch der Nachweis von lokalen *clustern* aus 4-6 Goldpartikeln in vielen Chloroplasten spricht gegen eine zufällige Verteilung der Partikel und bestätigt die Lokalisation von cry3 in den Chloroplasten. Die Gesamtmenge an nachweisbaren Goldpartikeln war insgesamt relativ gering, obwohl für diese Experimente die cry3-Überexpressionslinie verwendet worden war. Cry3 konnte nur innerhalb einigen Mitochondrien detektiert werden. Der Nachweis von cry3 in den Mitochondrien spricht somit gegen eine reine Assoziation von cry3 mit der äußeren Membran dieser Organellen. Die Untersuchungen ermöglichen keine Aussage über eine spezifische Lokalisation von Cryptochrom 3 innerhalb der Organellen, denn in den Chloroplasten konnte das cry3-Signal nicht mit speziellen plastidären Strukturen in Verbindung gebracht werden. Die Immunogoldstudien konnten somit keine weiteren Hinweise auf eine mögliche Funktion in den Organellen von *Arabidopsis thaliana* erbringen, die mit einer speziellen Subkompartimentierung zusammen hängen würde. Durch die verwendete Präparationstechnik der Schnitte sind allerdings keine Thylakoid-Strukturen in den Chloroplasten erkennbar. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass cry3 in den Plastiden mit den Thylakoid-Membranen assoziiert ist. Zusammen mit den Ergebnissen der Zellfraktionierung und den Lokalisationsstudien durch GFP-Analysen (Kleine et al., 2003) kann man mit sehr großer Sicherheit sagen, dass cry3 sowohl in die Chloroplasten, als auch in die Mitochondrien transportiert wird. Ein Artefakt bei den bisherigen Lokalisationsstudien durch GFP-Fusion und Überexpression ist somit auszuschließen, da bei den Untersuchungen durch Zellfraktionierung das endogene cry3-Protein in den Organellen nachgewiesen werden konnte. Neben cry3 konnten bislang noch einige weitere Proteine identifiziert werden, die über eine Transitsequenz verfügen, welche einen Transport in Chloroplasten und Mitochondrien ermöglicht. Der genaue Mechanismus dieses *dual targetings* ist bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt (Carrie et al., 2009).

Abgesehen von der Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien wurde cry3 durch das Immunogoldverfahren in einem Fall auch im Zellkern und dort speziell im Nukleolus nachgewiesen (Abbildung 36 A). Durch Untersuchungen von Julia Sommer konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um ein Artefakt handelt, da die Lokalisation von cry3 als GFP-Fusion in der Nähe der Nukleoli gezeigt wurde und isolierte Zellkerne in

Western-Blot Analysen ebenfalls ein *cry3* Signal zeigten. (J. Sommer, unpublizierte Daten). Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie *cry3* in den Zellkern transportiert wird. Möglicherweise enthält das Protein neben seiner dualen Targetingsequenz für die Organellen auch eine bislang unbekannte NLS (*nuclear localisation sequence*). Alternativ könnte der Kernimport über Proteininteraktion mit anderen Proteinen erfolgen. Die biologische Funktion von *cry3* im Nukleolus ist ebenso wie die Funktion in den Organellen von *Arabidopsis* unbekannt. Da der Nukleolus als Syntheseort von ribosomaler RNA gilt, liegt die Vermutung nahe, dass *cry3* in irgendeiner Weise an der rRNA-Synthese beteiligt ist. Außerdem stellt sich die Frage, ob Cryptochrom 3 in den Organellen und im Nukleolus an vergleichbaren Prozessen beteiligt ist.

4.2 Die lichtinduzierte Expression von *cry3* ist *phyA*-abhängig

Eine große Anzahl von Genen in *Arabidopsis* wird durch Licht reguliert. Als hauptverantwortliche Photorezeptoren für diese Transkript-Regulation dienen dabei die Cryptochrome und die Phytochrome (Ma et al., 2001). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob auch die *CRY3*-Expression einer Lichtregulation unterliegt. Erste Untersuchungen zur Transkriptregulation in etiolierten Keimlingen zeigten, dass blaues, rotes und auch dunkelrotes Licht die Expression von *CRY3* im Vergleich zur Dunkelkontrolle induziert. Dunkelrot-Bestrahlung führte jedoch im Vergleich mit den anderen Wellenlängen zu einem wesentlich größeren Anstieg der *CRY3*-Expression. Diese Ergebnisse konnten durch die Analyse der *microarray* Daten von Kretsch et al. (TAIR - www.arabidopsis.org - Submission Number: ME00345) bestätigt werden. Eine *cry3*-spezifische Auswertung dieser Daten ist im Anhang in Abbildung 43 A gezeigt. Auch hier war dunkelrotes Licht bei der Induktion der *CRY3*-Expression besonders effektiv. Die Unterschiede zwischen den *realtime* PCR-Ergebnissen und den *microarray* Daten bei der Transkriptinduktion durch Rot- und Blaulicht lassen sich durch die verwendeten Bestrahlungszeiten und die unterschiedlichen Ökotypen (Ler bei *realtime* PCR und Col bei *microarray*) erklären. Die starke Transkript-Induktion durch dunkelrotes Licht spricht für eine Beteiligung von Phytochrom A an der Regulation der *CRY3*-Expression. Da *CRY3* aber auch durch blaues Licht und UV-A-Strahlung induziert wird (Abbildung 43 A), könnten auch *cry1* und *cry2* bzw. die Phototropine die *CRY3*-Expression beeinflussen.

Durch eine genauere kinetische Analyse der Wirkung von DR-Bestrahlung auf die *CRY3*-Expression konnte eine transiente Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge nachgewiesen werden. Bezüglich der zeitlichen Abfolge dieser Induktion konnten jedoch Unterschiede zwischen den Ökotypen Landsberg erecta und Columbia festgestellt werden. Die *CRY3*-Expression bei Columbia-Pflanzen reagiert früher auf die DR-Bestrahlung und erreicht die maximale Transkriptmenge bereits nach 2-4 h, während das Maximum bei Ler erst nach 12 h im DR erreicht wird. Die Gründe für diese unterschiedliche Reaktion der Ökotypen sind bislang unbekannt. Die Beteiligung von Phytochromen an der Regulation von *CRY3* konnte jedoch eindeutig durch die Analyse von Mutanten demonstriert werden. Während die *phyA*-Mutanten nur noch

geringfügig auf die DR-Bestrahlung reagierten, war bei den *phyA/B*-Doppelmutanten keinerlei Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge mehr festzustellen. Somit konnte wie erwartet Phytochrom A als der hauptverantwortliche Photorezeptor für die *CRY3*-Transkriptregulation in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Auch Phytochrom B scheint geringfügig an dieser Regulation beteiligt zu sein. Vergleichbare Ergebnisse ergab auch die Analyse der *microarray* Daten von Tepperman et al. (2006). Die *CRY3*-Transkript-Induktion nach 1 h Rotlicht-Bestrahlung wird demnach hauptsächlich durch *phyA* vermittelt (Abbildung 43 B). Cryptochrom 3 zählt also zu den Phytochrom-regulierten *early response* Genen. Bereits durch frühere Studien wurde von Tepperman et al. (2001) gezeigt, dass viele Gene *phyA*-abhängig bereits nach 1 h Dunkelrotbestrahlung induziert werden. Bei den meisten dieser induzierten Gene handelt es sich um Transkriptionsfaktoren und chloroplastenspezifische Gene, die, ähnlich wie in dieser Arbeit für *CRY3* gezeigt wurde, wenige Stunden nach DR-Bestrahlung eine transiente Erhöhung der Transkriptmenge aufweisen (Tepperman et al., 2001). Überraschenderweise ist *phyB* aber bei der Regulation der *early responsive* Gene durch Rotlicht in Abwesenheit von *phyA* nur geringfügig beteiligt. Entgegen der allgemeinen Annahme, dass Phytochrom B der wichtigste Photorezeptor für rotes Licht sei, dient bei diesen früh induzierten Genen der Deetiolierungsphase hauptsächlich Phytochrom A als verantwortlicher Photorezeptor im Rot- und Dunkelrotlicht (Tepperman et al., 2006). In Übereinstimmung mit den erzielten Ergebnissen für die *CRY3*-Regulation wird die Transkript-Induktion der meisten *early responsive* Gene bei Abwesenheit von Phytochrom A und B vollständig unterdrückt. Andere Phytochrome scheinen demnach an diesem Prozess nicht beteiligt zu sein.

Nach den Studien von Tepperman et al. (2006) und Monte et al. (2004) erfolgt die Regulation von einem Teil dieser *early responsive* Gene durch PIF3 als Signalpartner. Die meisten dieser durch PIF3 regulierten Gene sind an der Funktion und Entwicklung von Chloroplasten beteiligt. Auch an der phytochromabhängigen Transkript-Induktion von *CRY3* ist PIF3 zumindest teilweise beteiligt (Abbildung 14 B). Zusammen mit der nachgewiesenen Plastidenlokalisation von *cry3* deuten diese Ergebnisse also möglicherweise auf eine Beteiligung von Cryptochrom 3 an der Regulation der lichtinduzierten Chloroplasten-Biogenese hin. Neben der Regulation durch PIF3 konnte auch eine Beteiligung von PIF1 an der *CRY3*-Transkript-Induktion durch dunkelrotes Licht nachgewiesen werden (Abbildung 14 A). Ebenso wie bei der *pif3*-Mutante ist die *CRY3*-Transkript-Induktion bei der *pif1*-Mutante nur reduziert und wird nicht vollständig unterdrückt. Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Redundanz der verschiedenen PIF-Proteine bei der Phytochrom-Signalweiterleitung. Bei einer *pif1/pif3*-Doppelmutante wäre daher vermutlich die *CRY3*-Induktion geringer als bei den Einzelmutanten. Außerdem ließe eine Untersuchung der Doppelmutante auch auf eine mögliche Beteiligung weiterer PIF-Proteine schließen. Für eine Beteiligung der PIFs an der phytochromabhängigen Regulation der *CRY3*-Expression spricht auch das Vorhandensein eines konservierten G-Box-Motivs im Promotorbereich von *CRY3* (Abbildung 38). Die G-Box (CACGTG) wurde als Erkennungssequenz für die PIF-Proteine identifiziert und lässt sich in vielen durch

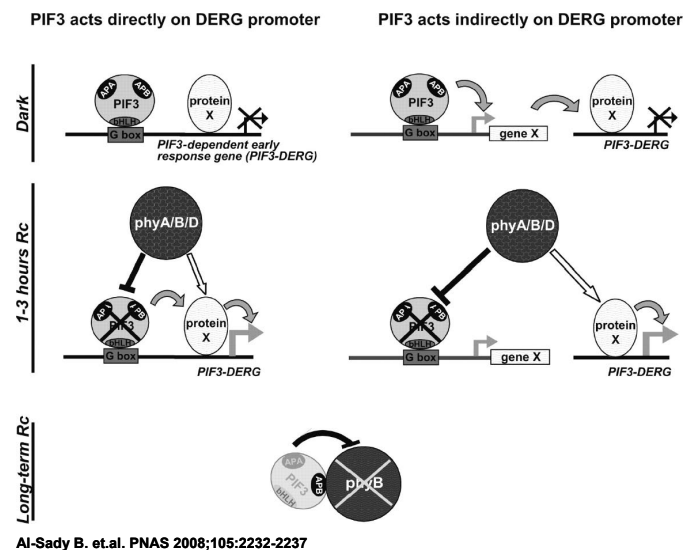


Abbildung 34: Modell zur unterschiedlichen PIF3-Wirkung bei der frühen Licht-induzierten Genexpression und Phytochrom-Langzeitantworten (Abbildung aus Al-Sady et al. (2008)).

Phytochrom regulierten Genen finden (Martínez-García et al., 2000; Monte et al., 2004). Die hier untersuchte T-DNA-Insertionslinie 26566 (5' T-DNA) enthält 8 bp stromaufwärts der G-Box eine T-DNA-Insertion. Obwohl die G-Box-Sequenz noch vollkommen intakt ist (Abbildung 38), kann man in dieser Linie keinerlei Regulation der *CRY3*-Expression während der De-etiolierung im DR beobachten (Abbildung 13 B). Möglicherweise werden durch die T-DNA-Insertion weitere flankierende Sequenzen außerhalb des eigentlichen G-Box-Motivs oder die Bindung regulatorischer Proteine an die G-Box beeinträchtigt, welche ebenfalls für eine spezifische Bindung der PIFs an den *CRY3*-Promotor notwendig sind. Alternativ könnten auch weitere Faktoren, die mit dem *CRY3*-Promotor interagieren, die spezifische PIF-Bindung beeinflussen. Der Effekt von flankierenden Sequenzen auf die spezifische Bindung der PIFs an die G-Box-Sequenz wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (T. Littlewood, 1998; Massari und Murre, 2000; Moon et al., 2008; Oh et al., 2007). Obwohl die direkte Bindung von PIF1 an die Promotoren einiger Gene nachgewiesen wurde, zeigen die G-Boxen anderer Gene, wie z.B. *GA3ox1* und *GA3ox2*, keine Interaktion mit PIF1 (Oh et al., 2007). Viele Gene werden also nur indirekt durch die PIFs reguliert und auch die Phytochrom-abhängige *CRY3*-Regulation wird möglicherweise nur indirekt durch PIF1 und PIF3 gesteuert. Für eine solche indirekte Regulation von *CRY3* sprechen auch die Untersuchungen von Oh et al. (2009). In einer *chromatin immunoprecipitation-chip (ChIP-chip)* Analyse konnte keine direkte Bindung von PIF1 an den *CRY3*-Promotor nachgewiesen werden.

Eine solche indirekte Regulation durch einen weiteren bisher unbekannten Faktor stellt zudem eine mögliche Erklärung für die beobachtete transiente Transkriptinduktion von *CRY3* und vielen anderen *early responsive* Genen dar. Nach dem Modell von Al-Sady et al. (2008) ist neben PIF3 ein bisher unbekanntes Protein X für die lichtabhängige Induktion der *early*

responsive Gene notwendig. Die Expression dieses Faktors würde durch PIF3 im Dunkeln konstitutiv induziert. Protein X würde somit als lichtabhängiger Transkriptionsfaktor an den *CRY3*-Promotor binden, aber erst nach Aktivierung durch Licht die Expression von *CRY3* induzieren. Da PIF3 durch die Interaktion mit lichtaktiviertem Phytochrom abgebaut wird, sinkt bei anhaltender Bestrahlung schließlich die Menge an verfügbarem Protein X, wodurch letztendlich auch die *CRY3*-Expression reduziert wird (Abbildung 34, rechts).

Obwohl die Transkriptmenge von *CRY3* während der frühen Deetiolierungsphase nur kurzzeitig ansteigt, wirkt sich diese Transkriptregulation auch auf die *cry3*-Proteinkonzentration in der Zelle aus (Abbildung 13 C und D). Dies spricht dafür, dass die beschriebene Regulation der *CRY3*-Transkripte für die Deetiolierung von Keimlingen im Rot- und Dunkelrotlicht tatsächlich biologisch relevant ist. Somit ist es möglich, dass *cry3* eine Rolle bei der Regulation der lichtinduzierten Chloroplastenbiogenese spielt.

4.3 Die *CRY3*-Expression unterliegt einem diurnalen Rhythmus

Die circadiane Expression der mRNA von Cryptochrom-DASH aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) wurde bereits von Facella et al. (2006) gezeigt. In der Tomate verläuft die *cryDASH*-Expression unter Langtagbedingungen (16 h Licht) mit zwei Expressionsmaxima innerhalb von 24 h. Die *cryDASH*-Transkriptmenge erreicht jeweils zu Beginn der Lichtphase und vor dem Ende der Lichtphase nach etwa 12 h ein Maximum. Dieser Rhythmus bleibt auch bei Pflanzen im Dauerlicht erhalten. Die mRNA-Expression von *cryDASH* in der Tomate steht also eindeutig unter der Kontrolle der Inneren Uhr. Für *cryDASH* sehen Facella et al. (2006) dabei eine Rolle bei der Antizipierung von Sonnenaufgang und Sonnenuntergang. *CryDASH* ist dieser Ansicht nach an den *input* Signalwegen der Inneren Uhr beteiligt.

Auch die *CRY3*-Expression in *Arabidopsis thaliana* unterliegt einem diurnalem Rhythmus (Abbildung 15). Im Gegensatz zu den Untersuchungen an Tomatenpflanzen wurde der Rhythmus nicht unter Langtagbedingungen bestimmt, sondern in einem Licht / Dunkel-Zyklus von jeweils 12 h. Obwohl die rhythmische Expression von *cryDASH* bei *Arabidopsis* eine ähnliche Amplitude aufweist wie bei Tomate, zeigt der Expressionsverlauf innerhalb von 24 h deutliche Unterschiede. Die *Arabidopsis CRY3*-Expression erreicht zwar ebenso wie die Expression von *cryDASH* in Tomate ein Maximum zu Beginn der Lichtphase, ein zweites Expressionsmaximum am subjektiven Abend gibt es bei *Arabidopsis* in einem 12 h Zyklus jedoch nicht. Die *realtime* PCR Ergebnisse zur diurnalen Rhythmik konnten außerdem durch die Analyse verschiedener *microarray* Daten bestätigt werden (Bläsing et al., 2005; Smith et al., 2004; Mockler et al., 2007). Die *CRY3*-Expressionsdaten der *microarray* Experimente stimmen dabei sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein (Abbildungen 15 und 44 A). Zwar kann allein durch die hier durchgeführten Versuche nicht eindeutig belegt werden, ob die *CRY3*-Expression tatsächlich durch die Innere Uhr reguliert wird. Die andauernde rhythmische *cryDASH*-Expression im Dauerlicht bei Tomate und weitere *microarray* Daten zeigen

allerdings, dass auch Cryptochrom 3 in *Arabidopsis* einer echten circadianen Kontrolle unterliegt. Nach den *microarray* Daten von Edwards et al. (2006) und Mockler et al. (2007) wird *CRY3* auch im Dauerlicht weiterhin rhythmisch exprimiert, nachdem die Pflanzen zuvor an einen 12 h Licht/Dunkel-Zyklus angepasst worden waren (Abbildung 44 B).

Die unterschiedliche diurnale Rhythmik bei *Arabidopsis* und Tomate könnten durch die verwendeten unterschiedlichen Licht/Dunkel-Zyklen oder auch durch einen generellen Unterschied bei der Regulation von *cryDASH* in *Arabidopsis* im Vergleich zu Tomate erklärt werden. Interessanterweise belegen die *microarray* Daten von Kay und Yanovsky (Mockler et al., 2007), dass die *CRY3*-Expression von *Arabidopsis* unter Langtagbedingungen einen ähnlichen diurnalen Rhythmus aufweist, wie er für Tomate nachgewiesen wurde (Facella et al., 2006). Auch hier gibt es jeweils ein Expressionsmaximum zu Beginn und am Ende der Lichtphase (Abbildung 44 D). Im Kurztag dagegen scheint sich der Rhythmus im Vergleich zu einem 12 h Licht/Dunkel-Zyklus leicht zu verschieben. Die *CRY3*-Expression erreicht dann mitten in der Lichtphase ihr Maximum (Abbildung 44 C). Die Expression von Cryptochrom 3 scheint somit neben der Tageszeit auch durch die Photoperiode beeinflusst zu werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass *cry3* nicht nur an der circadianen, sondern auch an der photoperiodischen Kontrolle verschiedener Gene beteiligt ist. Ein möglicher Einfluss von *cry3* auf die circadiane Regulation von Plastidengenen wird in Abschnitt 4.8 noch einmal diskutiert.

4.4 Cryptochrom 3 hat keinen offensichtlichen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung

Ein möglicher Einfluss von *cry3* auf eine Vielzahl von Entwicklungsparametern wurde in dieser Arbeit untersucht. Eine veränderte *CRY3*-Expression hat jedoch keine offensichtliche Auswirkung auf das Wachstum und die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*. Cryptochrom 3 ist also nicht, wie *cry1* und *cry2*, an der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums oder der Regulation des Blühzeitpunktes beteiligt. Das beobachtete verringerte Wurzelwachstum der Keimlinge und die kleinere Kotyledonenfläche bei der $\Delta cry3$ -Mutante tritt nur im Vergleich zu der Nos-WT-Linie auf und ist höchstwahrscheinlich durch die verspätete Samenkeimung dieser Linie zu erklären. Wie in Abschnitt 4.6 eingehender diskutiert wird, ist dieser Effekt möglicherweise auf eine weitere Mutation in der $\Delta cry3$ -Mutante zurückzuführen und somit von Cryptochrom 3 völlig unabhängig. Das Fehlen eines offensichtlichen Einflusses von *cry3* auf das Wachstum und die Entwicklung von *Arabidopsis* ist eventuell auf eine redundante Funktion von *cry3* und anderen Photorezeptoren zurückzuführen. Vielleicht lässt sich also nur im Kontext mit anderen Photorezeptormutationen, wie z.. B. *cry1* und *cry2*, eine Funktion von *cry3* nachweisen.

Für den *phytochrome interacting factor 1* (PIF1) in *Arabidopsis* wurde von Huq et al. (2004) ein Einfluss auf die Chlorophyll-Biosynthese beschrieben. In der *pif1*-Mutante konnte ein erhöhter Protochlorophyllid-Gehalt in etiolierten Keimlingen nachgewiesen werden, was nach

WL-Bestrahlung zu einer Bleichung der Keimlinge führt. Wie in Abschnitt 3.2.1 bereits gezeigt wurde, wird die lichtabhängige Expression in etiolierten Keimlingen durch PIF1 beeinflusst. Zudem enthält der Promotorbereich von *CRY3* (wie oben bereits ausgeführt) eine G-Box, also ein DNA-Motiv, welches spezifisch mit PIF-Proteinen interagiert. PIF1 könnte daher durch die Regulation der *CRY3*-Expression die Chlorophyll-Biosynthese beeinflussen. Obwohl die durchgeführten Experimente eine verstärkte Akkumulation von Protochlorophyllid in etiolierten *pif1*-Mutanten bestätigen konnten, zeigte die *cry3*-Mutante keinen Einfluss auf die Protochlorophyllid-Menge in etiolierten Keimlingen. Cry3 ist an der PIF1-abhängigen Regulation der Chlorophyll-Biosynthese also nicht beteiligt.

Die Signaltransduktion der Akklimatisations-Reaktionen, also der Anpassung des Photosynthese-Apparates an unterschiedliche Lichtintensitäten, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Da Blaulicht bei einigen dieser Reaktionen besonders effektiv ist, wird für die Lichtwahrnehmung ein Blaulicht-Photorezeptor diskutiert. Die Lichtintensität beeinflusst unter anderem die Stapelung der Grana-Thylakoide in den Chloroplasten, wodurch sich auch das Chlorophyll A/B-Verhältnis in den Chloroplasten ändert. An dieser Reaktion sind allerdings weder *cry1* und *cry2*, noch Phototropin 1 beteiligt (Weston et al., 2000). Auch *cry3* scheint für diese Akklimatisationsreaktion nicht der verantwortliche Photorezeptor zu sein, da die Überexpression und der *knock-out* von Cryptochrom 3 keine Auswirkung auf das Chlorophyll A/B-Verhältnis in den Pflanzen hat (Abbildung 22).

4.5 Regulation von Plastidengenen

Die Regulation von Genen in Plastiden und Mitochondrien galt zu Beginn dieser Arbeit als eine sehr vielversprechende mögliche Funktion von Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana*. Für *cryDASH* aus *Synechocystis* wurde von Brudler et al. (2003) durch eine *microarray* Analyse gezeigt, dass die Regulation einiger Gene in der *cryDASH*-Mutante verändert ist. Zudem ist *cryDASH* in *Synechocystis* an der Induktion von *psbA* zur *de novo* D1-Protein-Synthese beteiligt. Hohe Lichtintensitäten und UV-Licht führen besonders zu einer Schädigung der D1- und D2-Proteine im Reaktionszentrum von Photosystem II. Um eine erhöhte Neusynthese des D1-Proteins zu gewährleisten, wird daher in *Synechocystis* die *psbA*-Expression durch UV-B Strahlung, aber auch durch UV-A und sichtbares Licht deutlich induziert (Máté et al., 1998; Vass et al., 2000). In der *Synechocystis cryDASH*-Mutante ist diese Transkript-Induktion dagegen vor allem bei UV-B- und UV-A-Bestrahlung deutlich reduziert (Kleine, 2003). Eine ähnliche regulatorische Funktion wäre also ebenso für *cry3* aus *Arabidopsis* denkbar. Auch die beschriebene DNA-Bindung durch *cry3* würde zu einer Funktion als Transkriptionsregulator passen.

Bei *Arabidopsis* wurde bisher vor allem die blaulichtspezifische Regulation des *psbD*-Gens durch den Sigma-Faktor 5 untersucht (Thum et al., 2001; Tsunoyama et al., 2004; Mochizuki et al., 2004). Auch die Transkription anderer chloroplastenkodierter Gene wird durch Licht

reguliert. Die Expression von *psbA*, *rbcL* und 16 S rDNA wird in den Blättern von *Arabidopsis* vor allem durch UV-A und Blaulicht induziert (Chun et al., 2001). Für die *psbA*-Transkript-Induktion konnte dabei eine Beteiligung von Phytochrom A nachgewiesen werden. Dagegen scheint die *rbcL*-Expression zumindest im Blaulicht nicht durch *phyA* reguliert zu werden. Auch eine Regulation durch *cry1* und *phyB* wurde ausgeschlossen. In dieser Arbeit wurde daher überprüft, ob Cryptochrom 3 bei der UV-A/Blaulicht-spezifischen Transkript-Induktion in Chloroplasten eine Rolle spielt. Für die *rbcL*- und *psaA*-Transkripte konnte in dunkeladaptierten Pflanzen nach UV-A-Bestrahlung eine ähnliche Transkript-Induktion nachgewiesen werden, wie sie von Chun et al. (2001) beschrieben wurde. Weder der *knock-out*, noch die Überexpression von *cry3* hat jedoch einen Einfluss auf diese Regulation der untersuchten Chloroplastengene. Cryptochrom 3 scheint demnach zumindest in adulten Blättern nicht an der Transkriptionsregulation durch UV-A und Blaulicht in den Plastiden beteiligt zu sein. Weitere vorläufige Ergebnisse zur Induktion der Plastidentranskripte durch Rotlicht zeigen, dass die Expression von *rbcL* und *psaA* auch durch Bestrahlung mit Rotlicht induziert werden kann. Die *psbD*-Expression wird durch Rotlicht dagegen kaum beeinflusst (Abbildung 45 im Anhang). Diese Ergebnisse lassen sich gut mit der plastidären Genregulation durch kernkodierte Sigma-Faktoren erklären. Scheinbar werden *rbcL* und *psaA* unter diesen Bedingungen hauptsächlich durch AtSIG1 reguliert. Dieser Sigmafaktor wird in Blättern von dunkeladaptierten Pflanzen sowohl durch Blaulicht, als auch durch rotes Licht induziert (Onda et al., 2008). *PsbD* wird dagegen, wie bereits mehrfach eingehend untersucht wurde, durch den blaulichtspezifischen Sigma-Faktor 5 reguliert. Obwohl die hier untersuchten Plastidengene anscheinend durch Sigma-Faktoren reguliert werden, lässt sich eine Beteiligung von *cry3* bei der blaulichtspezifischen Transkript-Induktion anderer Gene nicht vollständig ausschließen. Eine generelle Funktion von *cry3* bei der Lichtregulation der plastidären Gene unter diesen Bedingungen ist allerdings eher unwahrscheinlich.

Wie eine *microarray* Studie von Ulm et al. (2004) ergab, ist Cryptochrom 3 eines von insgesamt nur 100 Genen, die bereits nach 1 h durch langwellige UV-B-Strahlung induziert werden. Diese Daten sprechen für eine mögliche Funktion von *cry3* bei der UV-B-vermittelten Signaltransduktion. Durch eine weitere Analyse der veröffentlichten *microarray* Daten wurde deutlich, dass die meisten plastidenkodierten Gene vor allem durch eine Bestrahlung mit kurzwelliger UV-B-Strahlung herunterreguliert werden. Die Transkriptmengen dieser Gene verringern sich dabei um 50-80%. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *cry3* möglicherweise als Photorezeptor oder Teil einer Signaltransduktionskette an der UV-B-vermittelten Reduktion der Chloroplastentranskripte beteiligt ist. Die UV-B-vermittelte Reduktion der plastidären Transkripte konnte durch *realtime* PCR-Experimente bestätigt werden. Ebenso wie die *microarray* Daten zeigen die *realtime* PCR-Ergebnisse, dass die *psaA*- und *rps11*-Transkriptmengen nach UV-B-Bestrahlung um jeweils 70% bzw. 60% reduziert werden. Diese Regulation erfolgt allerdings ebenso in der *cry3-knock-out*-Mutante (Abbildung 24). Eine Beteiligung von *cry3* an dieser Regulation der untersuchten plastidären Transkripte ist somit ebenfalls aus-

zuschließen. Da die Reduktion der Plastidentranskripte hauptsächlich erst längere Zeit nach der Behandlung mit kurzwelliger UV-B-Strahlung erfolgte, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass diese Reaktion nicht durch einen UV-B-Photorezeptor, sondern durch die Akkumulation von UV-Schäden in der Pflanzenzelle ausgelöst wird.

Auch grünes Licht hat Auswirkungen auf die Expression von plastidenkodierten Genen. Durch einen kurzen Grünlicht-Puls von nur $10 \mu\text{mol m}^{-2}$ wird ein Großteil der Transkripte in den Chloroplasten um 50-70% reduziert (Dhingra et al., 2006). Die Analyse von Mutanten zeigte, dass weder Cryptochrom 1 und 2, noch die Phototropine an dieser Reaktion beteiligt sind. Auch phyA und phyB wurden als verantwortliche Photorezeptoren ausgeschlossen (Dhingra et al., 2006). Die Abnahme der Transkriptmengen könnte entweder durch eine verringerte Transkription der Gene verursacht werden, oder durch eine Destabilisierung und den Abbau der vorhandenen Transkripte. Für eine mögliche Beteiligung von Cryptochrom 3 an dieser Grünlicht-induzierten Transkriptreduktion spricht zunächst die Lokalisation von cry3 in den Chloroplasten. Des Weiteren scheint außer cry3 kein Photorezeptor auf Transkriptebene durch Grünlicht reguliert zu werden. Der verwendete Grünlichtpuls von 10 s führte zu einer Induktion der *CRY3*-Transkriptmenge um das 5-fache (Abbildung 25 B und Dhingra et al., 2006). Für die "klassischen" Cryptochrome cry1 und cry2 aus *Arabidopsis thaliana* wurde bereits eine inhibitorische Wirkung von grünem Licht auf deren Aktivität beschrieben (Bouly et al., 2007; Banerjee et al., 2007). Auch cry3 könnte daher eine ähnliche Grünlicht-Antwort in den Chloroplasten auslösen und somit die Transkriptmengen in den Plastiden beeinflussen. Durch die Untersuchung von WT-Pflanzen und *cry3*-Mutanten mittels *realtime* PCR-Analyse konnte jedoch kein Einfluss von Cryptochrom 3 auf die Grünlicht-spezifische Transkriptreduktion in Chloroplasten nachgewiesen werden. Zunächst erbrachte die Analyse von verschiedenen plastidären Genen kein eindeutiges Ergebnis, da die gemessenen Transkriptmengen bei unabhängigen Experimenten eine relativ große Variabilität ergab. Die Reaktion hinsichtlich der Menge der Plastidentranskripte auf den Grünlichtpuls war relativ schwach, so dass bei WT-Pflanzen unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nur eine Reduktion der Transkripte um maximal 50% gemessen werden konnte. Auch die geringe Photonenflussdichte, die für diese Reaktion benötigt wurde, erschwerte eine genaue und reproduzierbare Dosierung des eingestrahlt Grünlichts. Für die weitere Analyse der Grünlicht-Antwort wurden daher die relativen Transkriptmengen des *psaA*-Gens durch 7 unabhängige Experimente bestimmt. Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass das *psaA*-Gen in der *cry3*-Mutante ebenso wie im WT durch Grünlicht reguliert wird. Auch an dieser Lichtregulation von plastidären Genen scheint cry3 somit nicht beteiligt zu sein.

Obwohl für cry3 anhand der durchgeführten Experimente also keine Funktion bei der Regulation von plastidenkodierten Genen nachgewiesen werden konnte, kann eine regulatorische Funktion von cry3 bei bestimmten Genen oder unter bestimmten Bedingungen letztendlich nicht völlig ausgeschlossen werden. Um einen möglichen Einfluss von Cryptochrom 3 auf die Transkription von plastidären, aber auch von mitochondrialen und nukleären Genen zu

untersuchen, wäre daher die Durchführung von *microarray* Experimenten zum Vergleich von WT-Pflanzen und *cry3*-Mutanten sinnvoll. Allerdings könnte auch bei diesen Experimenten eine mögliche *cry3*-Funktion unentdeckt bleiben, da *cry3*-spezifische Regulationsvorgänge möglicherweise nur unter sehr speziellen Bedingungen oder während bestimmter Entwicklungsstadien der Pflanzen stattfinden.

4.6 Ein Einfluss von *cry3* auf die Samenkeimung kann nicht völlig ausgeschlossen werden

Eine Funktion von *cry3* bei der Regulation der Samenkeimung konnte anhand der durchgeführten Experimente zwar nicht eindeutig nachgewiesen werden, dennoch lässt sich der Einfluss von Cryptochrom 3 auf die Samenkeimung nicht völlig ausschließen. Die 5' T-DNA-Insertionslinie mit einer Insertion im *CRY3*-Promotor zeigt einen signifikanten und robusten Keimungsphänotyp unter verschiedenen Lichtbedingungen. Die Keimungsfähigkeit dieser Linie ist bei Bestrahlung mit dunkelrotem, hellrotem und blauem Licht deutlich reduziert. Ein ähnlicher Keimungsphänotyp, der bei der $\Delta cry3$ -Mutante beobachtet worden war, ließ sich durch spätere Kontrollexperimente nicht eindeutig belegen. *Arabidopsis* WT-Pflanzen, die aus heterozygoten $\Delta cry3$ -Linien selektiert wurden, weisen eine ähnlich geringe Keimungsrate wie die *cry3-knock-out*-Pflanzen auf. Auch die Parental-Linie Ds6-393-19 (DS-WT), die ursprünglich für die Generierung der vorliegenden *CRY3*-Transposon-Insertionslinie verwendet worden war, diente als Kontroll-Linie bei den Keimungsexperimenten. Die Samen dieser Linie waren jedoch selbst unter optimalen Bedingungen fast gar nicht mehr keimungsfähig und konnten nur durch zusätzliche Gibberellin-Zugabe in ausreichender Zahl zur Keimung gebracht werden. Der beobachtete Keimungsphänotyp bei der $\Delta cry3$ -Mutante im Vergleich zu normalen Nos-WT-Pflanzen könnte also durch eine weitere Mutation in der ursprüngliche DS-Parentallinie verursacht werden. Da die Transposon-Linien durch eine Kreuzung mit bestimmten Aktivator-Linien entstehen, ist es möglich, dass die getesteten *cry3*-Mutanten diese zweite Mutation im heterozygoten Zustand tragen. Dadurch ließe sich erklären, dass die *cry3*-Mutanten zwar schlechter keimen als WT-Pflanzen, die Keimungsfähigkeit dieser Linie aber dennoch nicht völlig eliminiert ist, wie bei der DS-Parentallinie. Andererseits ist es auch möglich, dass *cry3* zwar, ebenso wie in der T-DNA-Linie, die Samenkeimung beeinflusst, der Effekt dieser *cry3*-spezifischen Regulation könnte aber durch die zweite unbekannte Mutation überlagert werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, könnte der Einfluss einer eventuell vorhandenen zweiten Mutation durch mehrfache Rückkreuzung der Mutante mit Nos-WT-Pflanzen eliminiert werden. Auch die Analyse weiterer *cry3 knock-out* Linien könnte eine mögliche Beteiligung von *cry3* an der Regulation der Samenkeimung eindeutig aufklären. Einen vielversprechenden Kandidaten für eine weitere Linie ohne funktionelles Cryptochrom 3 stellt die identifizierte Tilling-Linie mit einer Mutation in der *splice junction* Erkennungssequenz dar. Die Mutation führt voraussichtlich zu einem vorzeitigen Abbruch der

Translation von *cry3*, wobei diese Mutation bisher noch nicht durch eine *Western-blot* Analyse bestätigt werden konnte. Zudem scheint diese Linie noch andere Mutationen aufgrund der EMS-Mutagenese zu enthalten, da die Pflanzen in ihrer Entwicklung im Gegensatz zu den Transposon $\Delta cry3$ -Mutanten deutlich beeinträchtigt sind. Auch diese Linie müsste also zunächst durch mehrfache Rückkreuzung mit dem Wildtyp von unerwünschten zusätzlichen Mutationen befreit werden.

Obwohl die *CRY3*-Transkriptmenge bei der untersuchten RNAi-Linie um bis zu 80% reduziert war, war diese Linie in ihrem Keimungsverhalten im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle nicht beeinträchtigt. Dieses Ergebnis spricht zunächst gegen eine Funktion von *cry3* bei der Samenkeimung. Möglicherweise spielt bei dieser Antwort nicht die absolute *CRY3*-Menge, sondern nur die relative *CRY3*-Induktion eine Rolle. Auch in etiolierten *CRY3*-RNAi-Keimlingen findet nämlich bei DR-Bestrahlung ein Anstieg der *CRY3*-Transkriptmenge statt. Die Transkript-Induktion in den Keimlingen ist in der 5' T-DNA-Linie dagegen vollständig aufgehoben und ist somit mit der *CRY3*-Regulation in der *phyA/B*-Doppelmutante vergleichbar (Abbildung 13). Die *CRY3* Transkript-Induktion durch Licht könnte somit in der Tat auch bei der Samenkeimung von Bedeutung sein, weil bereits in den gequollenen Samen die *CRY3*-Transkripte ähnlich wie bei etiolierten Keimlingen durch Bestrahlung mit DR-Licht induziert werden (Abbildung 27). Der Keimungsphänotyp der 5' T-DNA-Linie könnte also durch die fehlende *CRY3*-Transkript-Induktion in den Samen erklärt werden.

Die Expressionsanalyse einzelner Gene des Gibberellin-Metabolismus spricht ebenfalls für eine Keimungsregulation durch Cryptochrom 3. Die Gibberellin-Biosynthesegene *GA3ox1* und *GA3ox2* werden indirekt über einen PIF1-abhängigen Mechanismus induziert, während die Expression des GA-abbauenden Enzyms *GA2ox2* herunterreguliert wird (Oh et al., 2007). Die lichtabhängige Expression dieser GA-Metabolismusgene in den Samen ist bei der $\Delta cry3$ -Mutante und der 5' T-DNA-Linie beeinträchtigt. Interessanterweise ist die Expression der GA-Gene bei Dauer-Dunkelrotbestrahlung in den $\Delta cry3$ -Mutanten in der gleichen Weise betroffen wie in der 5' T-DNA-Linie. Beide Linien zeigen im Gegensatz zu WT-Pflanzen keine DR-abhängige Induktion des *GA3ox1*-Gens (Abbildung 29). Auch die Aktivierung des *GA3ox2*-Gens ist in beiden Linien deutlich reduziert. Die Regulation des GA-abbauenden Enzyms *GA2ox2* scheint dagegen unter DR-Bedingungen nicht durch die *cry3*-Mutationen beeinträchtigt zu werden. Die beobachteten Veränderungen in der Regulation der GA-Gene könnten somit die reduzierte Keimungsfähigkeit der $\Delta cry3$ -Mutante und der 5' T-DNA-Linie erklären.

Sollte Cryptochrom 3 tatsächlich an der Regulation der Samenkeimung bei *Arabidopsis thaliana* beteiligt sein, so stellt sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Regulation. Für das PIF1-Protein konnte in dieser Arbeit eine Rolle bei der positiven Regulation der *CRY3*-Expression demonstriert werden. Interessanterweise spielt PIF1 auch eine entscheidende Rolle bei der lichtabhängigen Steuerung der Samenkeimung (Oh et al., 2004). Eine Möglichkeit wäre eine direkte positive Regulation von *GA3ox1* und *GA3ox2* durch Cryptochrom 3. Die *CRY3*-Expression würde nach diesem Modell bei Lichteinstrahlung zunächst durch PIF1

indirekt induziert werden. Die erhöhte cry3-Menge könnte schließlich zu einer Aktivierung der GA3ox-Gene führen und so die Samenkeimung unterstützen. Dieses Modell setzt allerdings eine Funktion von cry3 im Zellkern von *Arabidopsis* voraus. Cry3 konnte zwar auch im Zellkern identifiziert werden, die Lokalisation scheint sich allerdings auf den Nukleolus zu beschränken (J. Sommer, unpublizierte Daten). Die direkte Regulation von GA3ox1 und GA3ox2 durch cry3 erscheint daher also eher unwahrscheinlich. In einem alternativen Modell könnte cry3 die ersten Schritte der GA-Biosynthese in den Chloroplasten beeinflussen. Die Hormone GA und ABA scheinen sich gegenseitig negativ zu regulieren, wobei diese reziproke Regulation vermutlich durch eine veränderte Expression der Hormon-Biosynthese-Gene gesteuert wird (Seo et al., 2006; Oh et al., 2007; Seo et al., 2009). Die cry3-Mutation könnte sich demnach auf die Synthese von GA-Vorstufen in den Plastiden auswirken, was schließlich zu einer verringerten GA-Konzentration in den Samen führen würde. Die ABA-Konzentration stiege dadurch an, da die negative Wirkung von GA auf die ABA-Biosynthese abgeschwächt würde. Die erhöhte ABA-Konzentration wirkt letztlich wiederum negativ auf die Induktion der GA3ox-Gene. Somit ist es möglich, dass die veränderte Expression der Gibberellin-Biosynthese-Gene nur indirekt durch die cry3-Mutation verursacht wird.

Ob Cryptochrom 3 tatsächlich eine Funktion bei der lichtregulierten Keimungsinduktion von *Arabidopsis thaliana* hat, konnte in dieser Arbeit letztlich nicht eindeutig belegt werden. Falls sich der Einfluss auf die Keimung in Zukunft nicht durch weitere cry3-Mutantenlinien oder durch den Vergleich der Transposon-Linie mit einer rückgekreuzten WT-Linie nachweisen lässt, so bliebe die Frage offen, warum die 5' T-DNA-Linie einen Keimungsphänotyp zeigt. Möglicherweise enthält auch diese Linie neben der Insertion im CRY3-Promotor eine weitere Mutation, welche die geringere Keimung erklärt. Die Anzahl der T-DNA-Insertionen konnte für diese Linie bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Aber selbst durch eine Bestätigung des hier untersuchten Einflusses auf die Samenkeimung wäre noch kein Nachweis für eine Photorezeptorfunktion von Cryptochrom 3 erbracht. Besonders bei den Keimungsversuchen im Dauer-Dunkelrotlicht kann man eine direkte Aktivierung von cry3 durch Licht ausschließen. Zumindest für diese Funktion müsste also ein lichtunabhängiger Reaktionsmechanismus für cry3 postuliert werden.

4.7 cry3 knock-out oder Überexpression hat keinen Einfluss auf die DNA-Reparatur unter photoreaktivierenden Bedingungen

Von Kleine et al. (2003) war zunächst eine Funktion von Cryptochrom 3 als DNA-Photolyase ausgeschlossen worden, weil cry3 in Photolyase-defizienten *E. coli* Stämmen die Photoreaktivierung von UV-Schäden nicht wiederherstellen konnte. Selby und Sancar (2006) zeigten jedoch später, dass cry3 aus *Arabidopsis thaliana* in der Lage ist, UV-Schäden in einzelsträngiger DNA zu reparieren. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde diese ssDNA-Reparaturfunktion durch *in vitro* Experimente bestätigt. Selbst kleine loop Strukturen in doppelsträngiger DNA

von wenigen Basenpaaren um den UV-Schaden herum ermöglichen eine effiziente Reparatur des Schadens durch Cryptochrom 3 (Pokorny et al., 2008). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass cry3 zumindest in den Organellen die Photoreaktivierung von doppelsträngiger DNA bewirkt, sofern die UV-Läsionen transient in einem aufgeschmolzenen DNA-Bereich vorliegen. Weder die cry3-Mutante, noch die cry3-Überexpressions-Linie waren jedoch unter erhöhter UV-B-Bestrahlung in ihrem Wachstum deutlich beeinflusst. Die Mutante mit Defekt in der nukleären Klasse II CPD-Photolyase war unter diesen Bedingungen dagegen nicht überlebensfähig. Die UV-Dosis in den durchgeführten Experimenten war demnach ausreichend hoch, um einen möglichen Einfluss von cry3 auf die Photoreaktivierung von UV-Schäden in den Organellen nachweisen zu können. Der fehlende Phänotyp der Überexpressions-Linie unter diesen Bedingungen spricht allein noch nicht gegen eine Photolyasefunktion von cry3 in den Organellen. Möglicherweise ist für den Nachweis eines positiven Effektes der Überexpression von cry3 eine zusätzliche Steigerung der Reparatur von UV-Schäden in nukleärer DNA notwendig. Durch die Akkumulation von DNA-Schäden im Zellkern könnte der positive Einfluss von cry3 in den Organellen überdeckt werden. Andererseits wirkt sich die alleinige Überexpression der Klasse II CPD-Photolyase, die im Zellkern lokalisiert ist, positiv auf das Wachstum von *Arabidopsis* unter zusätzlicher UV-B-Bestrahlung aus (Kaiser et al., 2009). Das unveränderte Wachstum der $\Delta cry3$ -Mutante im Vergleich zum WT bei zusätzlicher UV-B-Bestrahlung spricht allerdings deutlich gegen eine wichtige Funktion von cry3 bei der Reparatur von DNA-Schäden *in vivo*. Ebenso wirkt sich die Mutation des cryDASH-Gens beim filamentösen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* nicht auf die Keimungsfähigkeit der Sporen nach UV-C-Bestrahlung aus (Veluchamy und Rollins, 2008). Diese phänotypischen Untersuchungen sprechen zusammen gegen eine wesentliche biologische Bedeutung der cryDASH-Proteine als Photolyase für die Reparatur von DNA.

Eine mögliche Photolyasefunktion von Cryptochrom 3 ist allein durch die phänotypische Untersuchung des Pflanzenwachstums im UV-B-Licht allerdings nicht völlig auszuschließen. Um eine mögliche DNA-Reparatur durch cry3 in den Organellen direkt zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit daher ein *realtime* PCR assay verwendet. Bei diesem System muss im Gegensatz zu anderen Methoden die DNA aus den Organellen nicht separat aufgereinigt werden und es treten keine Variationen durch Unterschiede im Reinheitsgrad der Organellenpräparationen auf. In WT-Keimlingen konnte dabei die Photoreaktivierung von genomischer DNA eindeutig belegt werden. Nach ca. 8 h Blaulichtbestrahlung waren die UV-induzierten DNA-Schäden nahezu vollständig repariert. Pflanzen, die nach der Schadens-Induktion im Dunkeln gehalten wurden und die *uvr*-Mutante im Blaulicht weisen dagegen auch nach 24 h nur eine geringe bzw. keine Reduktion der UV-Schäden in der genomischen DNA auf. In der CPD-Photolyase-Überexpressionslinie wurden die DNA-Schäden vermutlich bereits während der Bestrahlung mit dem Breitband-UV-B-Licht repariert und bei Beginn der Photoreaktivierungsphase sind keine DNA-Schäden mehr nachzuweisen. Bei der beobachteten Reparatur von genomischer DNA in WT-Keimlingen handelt es sich also tatsächlich um einen lichtabhängi-

gen Prozess, welcher durch die Klasse II CPD-Photolyase katalysiert wird. Ein lichtunabhängiger Mechanismus und die Reparatur von (6-4)-Photoprodukten scheint unter diesen Bedingungen keine große Rolle zu spielen. Die geringere Akkumulation von CPD-Schäden in der *Arabidopsis* Linie, die die Klasse II CPD-Photolyase überexprimiert, wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe durch andere Methoden nachgewiesen (Kaiser et al., 2009). Auch für *Oryza sativa* (Reis) wurde ein solcher Zusammenhang zwischen der Photolyase-Expression und der CPD-Akkumulation beschrieben (Hidema et al., 2007).

Für die plastidäre DNA konnte in WT-Keimlingen im Gegensatz zur genomischen DNA innerhalb des untersuchten Zeitraums von 24 h keine Reduktion der UV-Schäden gezeigt werden. Bei der mitochondrialen DNA konnte zwar eine sehr langsame Schadensreparatur beobachtet werden, allerdings konnte nicht eindeutig belegt werden, dass es sich dabei um einen lichtabhängigen Prozess handelt, weil es auch in den dunkel gehaltenen Keimlingen scheinbar zu einer geringfügigen Reparatur der UV-Schäden kam. Bisher gibt es teilweise widersprüchliche Aussagen zur lichtabhängigen DNA-Reparatur in den Organellen. Untersuchungen von Chen et al. (1996) und Hada et al. (1998) deuten darauf hin, dass in den Chloroplasten kein lichtabhängiger DNA-Reparatur-Mechanismus existiert. In isolierten Chloroplasten aus *Spinacia oleracea* (Spinat) konnte nach 2-stündiger Photoreaktivierung keine Reparatur von CPD-Schäden festgestellt werden (Hada et al., 1998). Auch eine Lichtbestrahlung von 8 h führte bei *Arabidopsis* Keimlingen nicht zu einer Reparatur der UV-induzierten DNA-Schäden in den Chloroplasten (Chen et al., 1996). Auf der anderen Seite konnte in einer *Glycine max* Zellkultur durch einen PCR-assay die lichtabhängige Reparatur von Plastiden-Genen demonstriert werden (Cannon et al., 1995). Nach 8 h Weißlichtbestrahlung waren dort die Schäden in den Chloroplasten vollständig repariert. Im Dunkeln fand dagegen keine Reparatur statt. Auch für *Arabidopsis* Keimlinge konnten Draper und Hays (2000) durch die Quantifizierung der DNA-Replikation in Kotyledonen zeigen, dass ein lichtabhängiger Reparaturmechanismus in den Chloroplasten und den Mitochondrien zu existieren scheint. Der Nachweis von Cannon et al. (1995) zur DNA-Reparatur in Chloroplasten steht zunächst einmal im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da hier in den Chloroplasten von WT-Zellen keine Photoreaktivierung beobachtet wurde. Diese Unterschiede sind möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Organismen zu erklären. Auch die Verwendung einer Suspensions-Zellkultur im Gegensatz zu intakten Keimlingen könnte die abweichenden Ergebnisse erklären. In den Keimlingen ist eine signifikante Photoreaktivierung der plastidären DNA vielleicht erst viel später nachzuweisen. So erfolgte der Nachweis der Photoreaktivierung in den Organellen durch Draper und Hays (2000) nur indirekt durch die Quantifizierung der Replikation von plastidärer und mitochondrialer DNA in einem Zeitraum von mehreren Tagen nach der Schadensinduktion.

Überraschenderweise hat die Expression von Cryptochrom 3 keinen nachweisbaren Einfluss auf die DNA-Reparatur in den Organellen. Entgegen der ursprünglichen Annahme, cry3 diene als Reparaturenzym in den Organellen, konnte bei der cry3-Überexpressionslinie und der

$\Delta cry3$ -Mutante kein signifikanter Unterschied zum WT bezüglich der DNA-Reparatur nachgewiesen werden. Die *cry3*-Expression beeinflusst also weder die DNA-Reparatur in den Chloroplasten und Mitochondrien, noch die Photoreaktivierung von genomischer DNA im Zellkern. Da in den Chloroplasten innerhalb von 24 h keine Photoreaktivierung beobachtet werden konnte, schließt das Ergebnis der $\Delta cry3$ -Mutante noch keine Photolyasefunktion in diesem Kompartiment aus. Allerdings wäre in diesem Fall, ähnlich wie bei der Klasse II CPD-Photolyase überexprimierenden Linie im Zellkern, eine erhöhte Reparaturaktivität in den Chloroplasten der *cry3ox*-Linie zu erwarten gewesen. Einen weiteren unerwarteten Befund stellt die deutlich erhöhte Reparaturaktivität in den Chloroplasten und den Mitochondrien der Klasse II CPD-Photolyase-Überexpressionslinie dar. Diese CPD-Photolyase scheint demnach ebenfalls in den Organellen aktiv zu sein. Auch Draper und Hays (2000) beschreiben, dass die von ihnen beobachtete DNA-Reparatur in Chloroplasten der *uvr2*-Mutante nicht mehr nachzuweisen ist. Eine Photolyaseaktivität in Proteinextrakten aus isolierten Chloroplasten konnte allerdings von Hada et al. (2000) nicht nachgewiesen werden und auch GFP-Lokalisationsstudien in unserer Arbeitsgruppe zeigen die Klasse II CPD-Photolyase nicht in den Chloroplasten und Mitochondrien (Kaiser et al., 2009). Daher wird von Kaiser et al. (2009) ein indirekter Einfluss der Photolyaseaktivität im Zellkern auf die Reparaturaktivität in den Organellen diskutiert. Die DNA-Reparatur in den Organellen der Klasse II CPD-Photolyase-Überexpressionslinie könnte demnach durch eine effizientere Reparatur von kernkodierten Genen beeinflusst werden. Obwohl die Klasse II CPD-Photolyase kein N-terminales Signalpeptid für eine Organellenlokalisierung besitzt, ist eine Funktion dieser Photolyase innerhalb der Organellen nicht vollständig auszuschließen. Wie bereits für einige andere Proteine nachgewiesen wurde (Miras et al., 2002; Übersicht in Jarvis, 2008), könnte der Import in die Organellen eventuell durch eine bisher nicht identifizierte interne Signalsequenz vermittelt werden. Möglicherweise ist die Konzentration in den Organellen zu gering, um die Lokalisation der Photolyase als GFP-Fusion in den Organellen direkt zu bestätigen. Vielleicht wird die Photolyase aber auch erst nach einer UV-B-Induktion sehr langsam in die Mitochondrien und Plastiden transportiert. Dieses Modell würde eine verzögerte Photoreaktivierung der plastidären Gene erklären, wie sie bereits von Cannon et al. (1995) beschrieben wurde. Neben der phänotypischen Analyse des Pflanzenwachstums unter UV-B-Bestrahlung und des fehlenden Einflusses der *cry3*-Expression auf die DNA-Reparatur spräche auch die mögliche Aktivität der CPD-Photolyase in den Organellen gegen eine Photolyasefunktion von Cryptochrom 3, denn somit bestünde keine Notwendigkeit für ein zusätzliches Reparaturenzym in den Chloroplasten und Mitochondrien. Ebenso kann die biologische Funktion von *cry3* nicht allein durch seine *in vitro* Aktivität als Photolyase für CPD-Schäden in einzelsträngiger DNA und in loop-Strukturen von Duplex DNA erklärt werden, denn auch andere CPD-Photolyasen sind in der Lage, UV-Schäden in DNA-Einzelsträngen effizient zu reparieren.

Da Cryptochrom 3 auch im Zellkern innerhalb des Nukleolus lokalisiert ist, wurde auch eine mögliche Reparaturfunktion von *cry3* in diesem Kompartiment überprüft. Der Nukleolus ist der

Syntheseort ribosomaler RNAs und cry3 könnte somit speziell an der Photoreaktivierung von rDNA-Sequenzen beteiligt sein. Die Ergebnisse der Schadensquantifizierung des 25 S rRNA-Gens wiesen jedoch eine relativ große Variabilität im Vergleich zu den vorherigen Versuchen auf. Möglicherweise wird die genaue Quantifizierung der DNA-Schäden mittels *realtime* PCR durch die große Kopienzahl der rRNA-Gene beeinträchtigt. Diese Ergebnisse sind demnach nur unter Vorbehalt zu interpretieren. Die Reparatur der rRNA-Sequenzen in WT-Keimlingen scheint deutlich weniger effizient zu sein, als die Reparatur der übrigen genomischen DNA. Die Photoreaktivierung der rRNA-Gene in der $\Delta cry3$ -Mutante scheint jedoch überraschenderweise wesentlich effizienter zu sein und ähnelt beinahe dem Reparaturverlauf der übrigen genomischen Sequenzen bei WT-Pflanzen. Eine mögliche Erklärung für diese unerwartete Beobachtung, sollte sie bestätigt werden können, ist die DNA-Bindung von cry3 im Nukleolus. Obwohl die CPD-Schäden durch cry3 nicht repariert werden, behindert cry3 eventuell eine effiziente Reparatur durch die Klasse II CPD-Photolyase. Eine spezifische Funktion von Cryptochrom 3 bei der Photoreaktivierung von DNA im Nukleolus kann durch diese Versuche wohl ebenso wie eine Reparaturfunktion in den Organellen ausgeschlossen werden.

4.8 Weitere mögliche Funktionen von Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana*

Da die Ergebnisse dieser Arbeit nicht eindeutig zeigen konnten, welche biologische Funktion Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana* *in vivo* hat, stellt sich weiterhin die Frage nach der Bedeutung von cry3 für die Pflanze. Obwohl die durchgeführten Versuche gegen eine *in vivo* Funktion als DNA-Photolyase sprechen, besteht dennoch die Möglichkeit, dass cry3 in den Organellen für die Reparatur von UV-Schäden in RNA zuständig ist. Mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden bis Tagen ist die Lebensdauer von plastidären Transkripten schließlich wesentlich höher als z.B. die Stabilität bakterieller mRNAs (Monde et al., 2000). Ob eine RNA-Reparatur in Organellen tatsächlich stattfindet bzw. von entscheidender Bedeutung für die Pflanzen ist, ist meines Wissens nach bisher vollkommen unbekannt. Zumindest für doppelsträngige RNA konnte nachgewiesen werden, dass RNA wesentlich resistenter gegen UV-Strahlung ist als DNA (Kundu et al., 2004). Eine allgemeine RNA-spezifische Reparatur von UV-Schäden durch die cryDASH-Proteine ist eher unwahrscheinlich. Zumindest für cryDASH aus *Vibrio cholerae* ist die Effizienz der Reparatur von einzelsträngiger RNA wesentlich geringer als die Effizienz für die Photoreaktivierung von einzelsträngiger DNA (Selby und Sancar, 2006). Außerdem können UV-Schäden in RNA-Sequenzen ebenfalls durch die anderen CPD-Photolyasen repariert werden. Auch eine Regulation der Translation durch eine direkte RNA-Bindung erscheint somit unwahrscheinlich, da cry3 anscheinend keine besonders hohe Affinität zu ungeschädigter RNA besitzt. Dennoch ist für cry3 eine Rolle bei der Regulation der Translation oder der post-translationellen Regulation von plastidären und mitochondrialen Proteinen nicht auszuschließen.

Eine weitere mögliche Funktion von cry3 in *Arabidopsis thaliana* ist eventuell die circadiane

Regulation der plastidären Genexpression. Wie bereits in Abschnitt 4.3 diskutiert wurde, unterliegt die *CRY3*-Expression selbst einer circadianen Rhythmik. Cryptochrom 3 könnte daher an der Übertragung der circadianen Rhythmik auf plastidäre Transkripte beteiligt und somit zumindest teilweise für die rhythmische Genexpression in den Chloroplasten verantwortlich sein. Für eine solche regulatorische Funktion von *cry3* sprechen erste Versuche zur diurnalen Expression in Chloroplasten. Die Ergebnisse wurden bisher jedoch noch nicht durch eine unabhängige Versuchsreihe bestätigt. Die Oszillation der Transkriptmengen von *psaA* und *psbD* fiel dabei innerhalb eines Licht-Dunkel-Zyklus nur sehr gering aus (Abbildung 46 im Anhang). Diese geringen Expressionsunterschiede zwischen Tag und Nacht lassen sich durch die *realtime* PCR nur sehr schwer quantifizieren. Ob die Transkriptmenge der plastidenkodierten Gene also tatsächlich einer circadianen Regulation unterliegt, konnte bisher noch nicht eindeutig belegt werden. Die Expression dieser Transkripte scheint bei der $\Delta cry3$ -Mutante in der Dunkelphase allerdings gegenüber dem WT erhöht zu sein. In der Literatur ist die circadiane Expression von plastidären Genen bei höheren Pflanzen noch nicht umfassend beschrieben worden. Eine starke circadiane Expression in den Chloroplasten konnte zwar bei der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* für viele Gene gezeigt werden, bei *Arabidopsis* beschränken sich die Untersuchungen zur rhythmischen Expression in den Plastiden bisher allerdings hauptsächlich auf das *psbD*-Gen. Beim Weizen (*Triticum aestivum*) oszilliert die relative *psbD*-Transkriptmenge mit relativ großer Amplitude, während das *psbA*-Gen dagegen im Tagesverlauf nur sehr geringe Unterschiede in der Transkriptmenge aufweist (Nakahira et al., 1998). Die circadiane Genexpression in den Chloroplasten scheint zumindest teilweise ebenso wie die Lichtregulation dieser Gene durch die kernkodierten Sigma-Faktoren gesteuert zu werden (Misquitta und Herrin, 2005). Die rhythmische Expression in den Plastiden wird somit vermutlich indirekt durch die Innere Uhr im Zellkern kontrolliert. Einige Sigmafaktoren bei *Arabidopsis*, darunter AtSIG1, AtSIG4 und AtSIG5, unterliegen tatsächlich einer circadianen Kontrolle (Diurnal project, <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/> (Mockler et al., 2007)). Die Expression von SIG5 im Tagesverlauf entspricht dabei sehr genau der hier gezeigten circadianen Expression von *CRY3*. Cryptochrom 3 könnte in *Arabidopsis thaliana* also neben den Sigmafaktoren eine Rolle bei der circadianen Regulation von plastidären Genen spielen. Obwohl die rhythmische Oszillation der Transkriptmengen der Chloroplastengene teilweise nur sehr gering und kaum nachzuweisen ist, könnte die Transkription dieser Gene dennoch einer circadianen Rhythmik unterliegen. Aufgrund der langen Lebensdauer plastidärer Transkripte kann aus der relativen Transkriptmenge die z.B. durch *realtime* PCR bestimmt wird, nicht direkt auf die Transkriptionsaktivität der sie kodierenden Gene geschlossen werden. Eine diurnale Regulation der Transkriptionsaktivität scheint sich zwar nicht oder nur sehr gering auf die Transkriptmengen in den Chloroplasten auszuwirken, eine funktionale Bedeutung dieser Rhythmik der Transkription ist aber dennoch vorstellbar. So könnten z.B. die Transkripte, die in der Lichtphase durch UV-Einwirkung geschädigt werden, durch eine erhöhte Transkriptionsaktivität ersetzt werden. Dieser Prozess ist durch die alleinige Bestimmung der relativen

Transkriptmengen vermutlich nicht oder nur sehr begrenzt zu belegen. Um also eine mögliche Beteiligung von *cry3* an einer solchen Regulation nachzuweisen, könnte auf alternative Techniken, wie dem *plastid run-on transcription assay* (Deng et al., 1987) zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität zurückgegriffen werden.

Eine vollkommen andere mutmaßliche Funktion von Cryptochrom 3 in *Arabidopsis thaliana* ergab sich aus den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Moldt et al. (2009) zur Photoreduktion des Folat-Cofaktors von *cry3*. Demnach handelt es sich bei der Bleichung des 5,10-Methenyl-THF Cofaktors durch intensives UV-A-Licht um eine spezifische Umwandlung in 5,10-Methylen-THF. Für eine effiziente Umwandlung ist außerdem die konservierte Tryptophan-Triade notwendig. Diese Elektronen-Transportkette ist also nicht nur für die Photoreduktion des FAD-Cofaktors zuständig. Das reduzierte FADH^+ dient bei dieser Reaktion, die auch bei der *E. coli* Photolyase beobachtet wurde, vermutlich als Elektronendonator für die Reduktion des 5,10-Methenyl-THF. Da Folate, unter anderem das 5,10-Methylen-THF, eine wichtige Bedeutung für viele Methylierungsreaktionen hat und S-Adenosylmethionin (SAM) eine direkte Vorstufe des Phytohormons Ethylen ist, könnte *cry3* somit neben den bisher bekannte Enzymen im Folatmetabolismus eine Rolle als lichtabhängiges Enzym bei der Folat-Synthese spielen. So könnte die in dieser Arbeit gezeigte lichtabhängige Induktion der *cry3*-Expression bei etiolierten Keimlingen möglicherweise eine ausreichende Folat-Versorgung der Keimlinge während der Ergrünungsphase sicherstellen. Moldt et al. (2009) konnten außerdem die *cry3*-abhängige Umwandlung von 5,10-Methenyl-THF in 5,10-Methylen-THF mit dem Enzym 5,10-Methylen-THF-Dehydrogenase koppeln, so dass ein lichtabhängiger Kreislauf entstand, bei dem durch die Dehydrogenase NADP^+ zu NADPH reduziert wurde. Vielleicht kann also in den Chloroplasten und Mitochondrien unabhängig von der Photosynthese durch das Zusammenspiel von *cry3* und der 5,10-Methylen-THF-Dehydrogenase NADPH bereitgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Obwohl Cryptochrom 3 schon sehr gut strukturell und biochemisch charakterisiert ist, konnte die biologische Funktion dieses Proteins in der Pflanze bisher noch nicht aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde die cry3-Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien durch Zellfraktionierung und Immunolokalisationsstudien eindeutig bestätigt. Damit konnten Artefakte in den bisherigen Untersuchungen durch die Überexpression und GFP-Fusion von cry3 ausgeschlossen werden.

Die *CRY3*-Expression wird auf der Transkript-Ebene durch Licht reguliert. *CRY3* wird während der Deetiolierungsphase hauptsächlich durch dunkelrotes Licht transient induziert. Phytochrom A konnte als der hauptverantwortliche Photorezeptor für diese Reaktion identifiziert werden. An dieser phytochromabhängigen Regulation sind auch PIF1 und PIF3 beteiligt. In ergrünten Pflanzen unterliegt die *CRY3*-Expression einer circadianen Regulation, welche anscheinend auch durch die Photoperiode beeinflusst wird.

Zur funktionellen Analyse von Cryptochrom 3 wurden verschiedene cry3-Linien hergestellt oder in verschiedenen Mutanten-Kollektionen identifiziert. Zur weiteren Untersuchung der cry3-Funktion steht eine cry3-Überexpressionslinie, eine RNAi-*knock-down*-Linie, eine cry3-*knock-out*-Linie mit einer Transposon-Insertion, verschiedene T-DNA-Insertionslinien mit veränderter *CRY3*-Expression bzw. verkürztem cry3 C-Terminus, sowie eine putative *knock-out*-Linie mit einer Punktmutation in der *splicing* Erkennungssequenz zur Verfügung. Zwei dieser Mutantenlinien waren in ihrer Keimungsfähigkeit unter spezifischen Bedingungen beeinträchtigt. Der Keimungsphänotyp konnte in dieser Arbeit allerdings nicht eindeutig belegt werden. Abgesehen von dieser reduzierten Keimrate waren bei den untersuchten transgenen cry3-Linien keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede festzustellen. Auch ein Einfluss von cry3 auf die Blau-, Grün- und UV-Licht-abhängige Regulation von plastidenkodierten Genen konnte nicht nachgewiesen werden.

Das Wachstum von *Arabidopsis* unter erhöhter UV-B-Bestrahlung wird durch cry3 nicht beeinflusst. Für cry3 ist zwar *in vitro* eine Photolyasefunktion bei einzelsträngiger DNA und doppelsträngiger DNA mit *loop*-Strukturen beschrieben worden, dennoch sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen eine *in vivo* Funktion von cry3 als DNA-Reparaturenzym, weil durch einen PCR-basierten Reparatur-assay kein Einfluss von cry3 auf die DNA-Reparatur in Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen werden konnte.

Literatur

- Ahmad M und Cashmore AR** (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **366**(6451):162–166
- Ahmad M, Galland P, Ritz T, Wiltshko R und Wiltshko W** (2007). Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **225**(3):615–624
- Ahmad M, Grancher N, Heil M, Black RC, Giovani B, Galland P und Lardemer D** (2002). Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **129**(2):774–785
- Ahmad M, Jarillo JA und Cashmore AR** (1998a). Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell*, **10**(2):197–207
- Ahmad M, Jarillo JA, Klimczak LJ, Landry LG, Peng T, Last RL und Cashmore AR** (1997). An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**(2):199–207
- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O und Cashmore AR** (1998b). The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell*, **1**(7):939–948
- Ahmad M, Lin C und Cashmore AR** (1995). Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J*, **8**(5):653–658
- Al-Sady B, Kikis EA, Monte E und Quail PH** (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(6):2232–2237
- Alabadí D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P und Kay SA** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, **293**(5531):880–883
- Arabidopsis-Genome-Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**(6814):796–815
- Aubert C, Mathis P, Eker AP und Brettel K** (1999). Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(10):5423–5427
- Bagnall DJ, King RW und Hangarter RP** (1996). Blue-light promotion of flowering is absent in hy4 mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, **200**(2):278–280

- Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Viana RM, Pokorny R, Ahmad M, Bittl R und Batschauer A** (2007). The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J Biol Chem*, **282**(20):14916–14922
- Barnes D, Cohen A, Bruick RK, Kantardjieff K, Fowler S, Efuet E und Mayfield SP** (2004). Identification and characterization of a novel RNA binding protein that associates with the 5'-untranslated region of the chloroplast psbA mRNA. *Biochemistry*, **43**(26):8541–8550
- Batschauer A** (1993). A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J*, **4**(4):705–709
- Batschauer A** (1999). Light perception in higher plants. *Cell Mol Life Sci*, **55**(2):153–166
- Bayram O, Biesemann C, Krappmann S, Galland P und Braus GH** (2008). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell*, **19**(8):3254–3262
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible WR und Stitt M** (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**(12):3257–3281
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH und Toole VK** (1952). A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **38**(8):662–666
- Bouly JP, Giovani B, Djamei A, Mueller M, Zeugner A, Dudkin EA, Batschauer A und Ahmad M** (2003). Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with Arabidopsis and human cryptochrome-1. *Eur J Biochem*, **270**(14):2921–2928
- Bouly JP, Schleicher E, Dionisio-Sese M, Vandenbussche F, Straeten DVD, Bakrim N, Meier S, Batschauer A, Galland P, Bittl R und Ahmad M** (2007). Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated through Interconversion of Flavin Redox States. *J Biol Chem*, **282**(13):9383–9391
- Brautigam CA, Smith BS, Ma Z, Palnitkar M, Tomchick DR, Machius M und Deisenhofer J** (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(33):12142–12147
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Ichi Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA und Getzoff ED** (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell*, **11**(1):59–67
- Bruick und Mayfield** (1999). Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends Plant Sci*, **4**(5):190–195

- Brunelle SA, Hazard ES, Sotka EE und Van Dolah FM** (2007). Characterization of a Dinoflagellate Cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *J Phycol*, **43**:509–518
- Burney S, Hoang N, Caruso M, Dudkin EA, Ahmad M und Bouly JP** (2009). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *FEBS Lett*, **583**(9):1427–1433
- Byrdin M, Eker APM, Vos MH und Brettel K** (2003). Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in Escherichia coli DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(15):8676–8681
- Canamero RC, Bakrim N, Bouly JP, Garay A, Dudkin EE, Habricot Y und Ahmad M** (2006). Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in Arabidopsis thaliana. *Planta*, **224**(5):995–1003
- Cannon GC, Hedrick LA und Heinhorst S** (1995). Repair mechanisms of UV-induced DNA damage in soybean chloroplasts. *Plant Mol Biol*, **29**(6):1267–1277
- Carrie C, Giraud E und Whelan J** (2009). Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Journal*, **276**:1187–1195
- Cashmore AR** (2003). Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*, **114**(5):537–543
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ und Liu D** (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, **284**(5415):760–765
- Castillon A, Shen H und Huq E** (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci*, **12**(11):514–521
- Chen JJ, Jiang CZ und Britt AB** (1996). Little or No Repair of Cyclobutyl Pyrimidine Dimers Is Observed in the Organellar Genomes of the Young Arabidopsis Seedling. *Plant Physiol*, **111**(1):19–25
- Cheung MS, Daizadeh I, Stuchebrukhov AA und Heelis PF** (1999). Pathways of electron transfer in Escherichia coli DNA photolyase: Trp306 to FADH. *Biophys J*, **76**(3):1241–1249
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR und Song PS** (1999). Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, **401**(6753):610–613
- Christie JM** (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol*, **58**:21–45
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E und Briggs WR** (1998). Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, **282**(5394):1698–1701

- Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA und Briggs WR** (2002). Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J*, **32**(2):205–219
- Chun L, Kawakami A und Christopher DA** (2001). Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol*, **125**(4):1957–1966
- Clack T, Mathews S und Sharrock RA** (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol*, **25**(3):413–427
- Clough SJ und Bent AF** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **16**(6):735–743
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS und Somerville CR** (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(7):3718–3723
- Daiyasu H, Ishikawa T, ichi Kuma K, Iwai S, Todo T und Toh H** (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells*, **9**(5):479–495
- Darwin C** (1880). The Power of movement in Plants. *Da Capo Press Reprint Ed, New York*
- de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E und Prat S** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**(7177):480–484
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L und Lerbs-Mache S** (2006). Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol*, **142**(3):993–1003
- Demarsy E und Fankhauser C** (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol*, **12**(1):69–74
- Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA und Quail PH** (1992). COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell*, **71**(5):791–801
- Deng XW, Stern DB, Tonkyn JC und Grissem W** (1987). Plastid run-on transcription. Application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J Biol Chem*, **262**(20):9641–9648
- Devlin PF und Kay SA** (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, **12**(12):2499–2510

- Dhingra A, Bies DH, Lehner KR und Folta KM** (2006). Green light adjusts the plastid transcriptome during early photomorphogenic development. *Plant Physiol*, **142**(3):1256–1266
- Draper CK und Hays JB** (2000). Replication of chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA during growth of unirradiated and UVB-irradiated Arabidopsis leaves. *Plant J*, **23**(2):255–265
- Duek PD, Elmer MV, van Oosten VR und Fankhauser C** (2004). The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol*, **14**(24):2296–2301
- Duek PD und Fankhauser C** (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J*, **34**(6):827–836
- Edwards KD, Anderson PE, Hall A, Salathia NS, Locke JCW, Lynn JR, Straume M, Smith JQ und Millar AJ** (2006). FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, **18**(3):639–650
- El-Assal SED, Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Raz V und Koornneef M** (2001). A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet*, **29**(4):435–440
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S und von Heijne G** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**(4):1005–1016
- Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J und Falkowski PG** (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(22):10237–10241
- Essen LO** (2006). Photolyases and cryptochromes: common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Curr Opin Struct Biol*, **16**(1):51–59
- Essen LO und Klar T** (2006). Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci*, **63**(11):1266–1277
- Facella P, Lopez L, Chiappetta A, Bitonti MB, Giuliano G und Perrotta G** (2006). CRY-DASH gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Lett*, **580**(19):4618–4624
- Fairchild CD, Schumaker MA und Quail PH** (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev*, **14**(18):2377–2391
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD und Chory J** (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science*, **284**(5419):1539–1541

- Fedoroff NV und Smith DL** (1993). A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis. *Plant J*, **3**(2):273–289
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM und Deng XW** (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*, **451**(7177):475–479
- Folta KM und Maruhnich SA** (2007). Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot*, **58**(12):3099–3111
- Folta KM und Spalding EP** (2001). Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J*, **26**(5):471–478
- Franklin KA und Whitelam GC** (2004). Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J Exp Bot*, **55**(395):271–276
- Fujimori T, Yamashino T, Kato T und Mizuno T** (2004). Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **45**(8):1078–1086
- Gegear RJ, Casselman A, Waddell S und Reppert SM** (2008). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in Drosophila. *Nature*, **454**(7207):1014–1018
- Giovani B, Byrdin M, Ahmad M und Brettel K** (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Biol*, **10**(6):489–490
- Guo H, Duong H, Ma N und Lin C** (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J*, **19**(3):279–287
- Guo H, Mockler T, Duong H und Lin C** (2001). SUB1, an Arabidopsis Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science*, **291**(5503):487–490
- Guo H, Yang H, Mockler TC und Lin C** (1998). Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science*, **279**(5355):1360–1363
- Gyula P, Schäfer E und Nagy F** (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, **6**(5):446–452
- Hada M, Hashimoto O, Nikaido O und Shin M** (1998). UVB-Induced DNA Damage and Its Photorepair in Nuclei and Chloroplasts of Spinacia oleracea L. *Photochemistry and Photobiology*, **68**(3):319–322
- Hada M, Hino K, Buchholz G, Goss J, Wellmann E und Shin M** (2000). Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**(6):1288–1291

- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA und Kay SA** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, **290**(5499):2110–2113
- Harris SR, Henbest KB, Maeda K, Pannell JR, Timmel CR, Hore PJ und Okamoto H** (2009). Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in Arabidopsis thaliana. *J R Soc Interface*
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC und Schäfer E** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol*, **128**(1):194–200
- Hidema J, Taguchi T, Ono T, Teranishi M, Yamamoto K und Kumagai T** (2007). Increase in CPD photolyase activity functions effectively to prevent growth inhibition caused by UVB radiation. *Plant J*, **50**(1):70–79
- Hitomi K, Okamoto K, Daiyasu H, Miyashita H, Iwai S, Toh H, Ishiura M und Todo T** (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of Synechocystis sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res*, **28**(12):2353–2362
- Hjorth E, Hadfi K, Gould S, Kawach O, Sommer M, Zauner S und Maier UG** (2004). Zero, one, two, three, and perhaps four - Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Res* 459-468, **15** (2):459–468
- Hoffman PD, Batschauer A und Hays JB** (1996). PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet*, **253**(1-2):259–265
- Huang Y, Baxter R, Smith BS, Partch CL, Colbert CL und Deisenhofer J** (2006). Crystal structure of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana and its implications for photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(47):17701–17706
- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K und Quail PH** (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, **305**(5692):1937–1941
- Huq E und Quail PH** (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *EMBO J*, **21**(10):2441–2450
- Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M und Wada M** (2002). Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss Physcomitrella patens. *Plant Cell*, **14**(2):373–386
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA und Kay SA** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*, **309**(5732):293–297

- Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR und Kay SA** (2003). FKFI is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. *Nature*, **426**(6964):302–306
- Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K und Sakai T** (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **16**(4):887–896
- Ito T, Motohashi R, Kuromori T, Noutoshi Y, Seki M, Kamiya A, Mizukado S, Sakurai T und Shinozaki K** (2005). A resource of 5,814 dissociation transposon-tagged and sequence-indexed lines of Arabidopsis transposed from start loci on chromosome 5. *Plant Cell Physiol*, **46**(7):1149–1153
- Jackson JA und Jenkins GI** (1995). Extension-growth responses and expression of flavonoid biosynthesis genes in the Arabidopsis hy4 mutant. *Planta*, **197**(2):233–239
- Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR und Cashmore AR** (2001). An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, **410**(6827):487–490
- Jarvis P** (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*, **179**(2):257–285
- Josse EM, Foreman J und Halliday KJ** (2008). Paths through the phytochrome network. *Plant Cell Environ*, **31**(5):667–678
- Kahn A, Goss JA und Smith DE** (1957). Effect of Gibberellin on Germination of Lettuce Seed. *Science*, **125**(3249):645–646
- Kaiser G, Kleiner O, Beisswenger C und Batschauer A** (2009). Increased DNA repair in Arabidopsis plants overexpressing CPD photolyase. *Planta*
- Kanai S, Kikuno R, Toh H, Ryo H und Todo T** (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol*, **45**(5):535–548
- Kanegae T und Wada M** (1998). Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern Adiantum capillus-veneris. *Mol Gen Genet*, **259**(4):345–353
- Kavakli IH und Sancar A** (2004). Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry*, **43**(48):15103–15110
- Kevei E und Nagy F** (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Plant*, **117**(3):305–313
- Kiba T, Henriques R, Sakakibara H und Chua NH** (2007). Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **19**(8):2516–2530

- Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, Oh E, Park J, Hanada A, Kamiya Y und Choi G** (2008). SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in Arabidopsis, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell*, **20**(5):1260–1277
- Kim J, Yi H, Choi G, Shin B, Song PS und Choi G** (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, **15**(10):2399–2407
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG und Somers DE** (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, **449**(7160):356–360
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M und Shimazaki K** (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, **414**(6864):656–660
- Kircher, Kozma-Bognar, Kim, Adam, Harter, Schafer und Nagy** (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell*, **11**(8):1445–1456
- Klar T, Pokorny R, Moldt J, Batschauer A und Essen LO** (2007). Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J Mol Biol*, **366**(3):954–964
- Klein M, Binder S und Brennicke A** (1998). *Methods in Molecular Biology Arabidopsis Protocols*, Vol 82, Seiten 49–53. Humana Press
- Kleine T** (2003). *Photolyase/Cryptochrom-Homologe aus Synechocystis sp. PCC 6803 und Arabidopsis thaliana: Funktion, Lokalisation und biochemische Eigenschaften. Dissertation.* Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Kleine T, Lockhart P und Batschauer A** (2003). An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J*, **35**(1):93–103
- Kleiner O, Butenandt J, Carell T und Batschauer A** (1999a). Class II DNA photolyase from Arabidopsis thaliana contains FAD as a cofactor. *Eur J Biochem*, **264**(1):161–167
- Kleiner O, Kircher S, Harter K und Batschauer A** (1999b). Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J*, **19**(3):289–296
- Komori H, Masui R, Kuramitsu S, Yokoyama S, Shibata T, Inoue Y und Miki K** (2001). Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(24):13560–13565
- Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I und Nagatani A** (2006). Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J*, **45**(6):994–1005

- Koornneef M, Bentsink L und Hilhorst H** (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol*, **5**(1):33–36
- Koornneef M, Hanhart CJ und van der Veen JH** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, **229**(1):57–66
- Koornneef M, Jorna ML, van der Swan DLCB und Karssen CM** (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **61**:385–393
- Kottke T, Batschauer A, Ahmad M und Heberle J** (2006). Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, **45**(8):2472–2479
- Kundu LM, Linne U, Marahiel M und Carell T** (2004). RNA is more UV resistant than DNA: the formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent. *Chemistry*, **10**(22):5697–5705
- Kunst L** (1998). *Methods in Molecular Biology, Arabidopsis Protocols, Vol 82*, Kapitel Preparation of Physiologically Active Chloroplasts from *Arabidopsis*., Seiten 43–48. Humana Press, Totowa, New Jersey
- Kuromori T, Hirayama T, Kiyosue Y, Takabe H, Mizukado S, Sakurai T, Akiyama K, Kamiya A, Ito T und Shinozaki K** (2004). A collection of 11 800 single-copy Ds transposon insertion lines in *Arabidopsis*. *Plant J*, **37**(6):897–905
- Labarca C und Paigen K** (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*, **102**(2):344–352
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259):680–685
- Landry LG, Stapleton AE, Lim J, Hoffman P, Hays JB, Walbot V und Last RL** (1997). An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(1):328–332
- Lange MJP und Lange T** (2006). Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biol (Stuttg)*, **8**(3):281–290
- Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR und Quail PH** (2008a). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell*, **20**(2):337–352

- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E und Quail PH** (2008b). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol*, **18**(23):1815–1823
- Lin C** (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, **14 Suppl**:S207–S225
- Lin C, Robertson DE, Ahmad M, Raibekas AA, Jorns MS, Dutton PL und Cashmore AR** (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science*, **269**(5226):968–970
- Lin C und Shalitin D** (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, **54**:469–496
- Lin C und Todo T** (2005). The cryptochromes. *Genome Biol*, **6**(5):220
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J und Cashmore AR** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(5):2686–2690
- Liscum E, Hodgson DW und Campbell TJ** (2003). Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiol*, **133**(4):1429–1436
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, Lisiero D und Lin C** (2008). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science*, **322**(5907):1535–1539
- Lopez-Juez E und Pyke KA** (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol*, **49**(5-6):557–577
- López-Juez E, Bowyer JR und Sakai T** (2007). Distinct leaf developmental and gene expression responses to light quantity depend on blue-photoreceptor or plastid-derived signals, and can occur in the absence of phototropins. *Planta*, **227**(1):113–123
- Lucas-Lledó JI und Lynch M** (2009). Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Mol Biol Evol*, **26**(5):1143–1153
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Ret ML, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L und Small I** (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**(8):2089–2103
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H und Deng XW** (2001). Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, **13**(12):2589–2607

- Maier UG, Bozarth A, Funk HT, Zauner S, Rensing SA, Schmitz-Linneweber C, Börner T und Tillich M** (2008). Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme? *BMC Biol*, **6**:36
- Malhotra K, Kim ST, Batschauer A, Dawut L und Sancar A** (1995). Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry*, **34**(20):6892–6899
- Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH und Yang HQ** (2005). From The Cover: A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(34):12270–12275
- Martínez-García JF, Huq E und Quail PH** (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**(5467):859–863
- Mason G, Provero P, Vaira AM und Accotto GP** (2002). Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol*, **2**:20
- Massari ME und Murre C** (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, **20**(2):429–440
- Matsumoto N, Hirano T, Iwasaki T und Yamamoto N** (2003). Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. *Plant Physiol*, **133**(4):1494–1503
- Matsushita T, Mochizuki N und Nagatani A** (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature*, **424**(6948):571–574
- Mees A, Klar T, Gnau P, Hennecke U, Eker APM, Carell T und Essen LO** (2004). Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science*, **306**(5702):1789–1793
- Meier S** (2004). *Untersuchungen zur Lokalisation und Expression von Cryptochrom 3 aus Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg
- Miras S, Salvi D, Ferro M, Grunwald D, Garin J, Joyard J und Rolland N** (2002). Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J Biol Chem*, **277**(49):47770–47778
- Misquitta RW und Herrin DL** (2005). Circadian Regulation of Chloroplast Gene Transcription: A Review. *Plant Tissue Cult*, **15**(1):83–101
- Møller SG, Kim YS, Kunkel T und Chua NH** (2003). PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**(5):1111–1119
- Mochizuki T, Onda Y, Fujiwara E, Wada M und Toyoshima Y** (2004). Two independent light signals cooperate in the activation of the plastid psbD blue light-responsive promoter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, **571**(1-3):26–30

- Mockler T, Yang H, Yu X, Parikh D, chia Cheng Y, Dolan S und Lin C** (2003). Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(4):2140–2145
- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H und Lin C** (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development*, **126**(10):2073–2082
- Mockler TC, Michael TP, Priest HD, Shen R, Sullivan CM, Givan SA, McEntee C, Kay SA und Chory J** (2007). The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **72**:353–363
- Moldt J, Pokorny R, Orth C, Linne U, Geisselbrecht Y, Marahiel MA, Essen LO und Batschauer A** (2009). Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family. *J Biol Chem*
- Monde RA, Schuster G und Stern DB** (2000). Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie*, **82**(6-7):573–582
- Monte E, Tepperman JM, Al-Sady B, Kaczorowski KA, Alonso JM, Ecker JR, Li X, Zhang Y und Quail PH** (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(46):16091–16098
- Moon J, Zhu L, Shen H und Huq E** (2008). PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(27):9433–9438
- Mori H und Cline K** (2001). Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta*, **1541**(1-2):80–90
- Motchoulski A und Liscum E** (1999). Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science*, **286**(5441):961–964
- Mouritsen H und Ritz T** (2005). Magnetoreception and its use in bird navigation. *Curr Opin Neurobiol*, **15**(4):406–414
- Más P, Devlin PF, Panda S und Kay SA** (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, **408**(6809):207–211
- Más P, Kim WY, Somers DE und Kay SA** (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature*, **426**(6966):567–570

- Máté Z, Sass L, Szekeres M, Vass I und Nagy F** (1998). UV-B-induced differential transcription of psbA genes encoding the D1 protein of photosystem II in the Cyanobacterium *synechocystis* 6803. *J Biol Chem*, **273**(28):17439–17444
- Mullet JE** (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol*, **103**(2):309–313
- Nagy F und Schäfer E** (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**:329–355
- Nakahira Y, Baba K, Yoneda A, Shiina T und Toyoshima Y** (1998). Circadian-regulated transcription of the psbD light-responsive promoter in wheat chloroplasts. *Plant Physiol*, **118**(3):1079–1088
- Nakajima S, Sugiyama M, Iwai S, Hitomi K, Otoshi E, Kim ST, Jiang CZ, Todo T, Britt AB und Yamamoto K** (1998). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, **26**(2):638–644
- Neff MM und Chory J** (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol*, **118**(1):27–35
- Ni M, Tepperman JM und Quail PH** (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, **400**(6746):781–784
- Ninu, Ahmad, Miarelli, Cashmore und Giuliano** (1999). Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant J*, **18**(5):551–556
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S und Chory J** (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol*, **57**:739–759
- Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y und Choi G** (2009). Genome-Wide Analysis of Genes Targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during Seed Germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**(2):403–419
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C und Choi G** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **16**(11):3045–3058
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, ping Sun T, Kamiya Y und Choi G** (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, **19**(4):1192–1208

- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI und Choi G** (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J*, **47**(1):124–139
- Ohgishi M, Saji K, Okada K und Sakai T** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(8):2223–2228
- Onda Y, Yagi Y, Saito Y, Takenaka N und Toyoshima Y** (2008). Light induction of Arabidopsis SIG1 and SIG5 transcripts in mature leaves: differential roles of cryptochrome 1 and cryptochrome 2 and dual function of SIG5 in the recognition of plastid promoters. *Plant J*, **55**(6):968–978
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N und Deng XW** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, **405**(6785):462–466
- Park H, Zhang K, Ren Y, Nadji S, Sinha N, Taylor JS und Kang C** (2002). Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(25):15965–15970
- Park HW, Kim ST, Sancar A und Deisenhofer J** (1995). Crystal structure of DNA photolyase from Escherichia coli. *Science*, **268**(5219):1866–1872
- Partch CL, Clarkson MW, Ozgür S, Lee AL und Sancar A** (2005). Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry*, **44**(10):3795–3805
- Peeters N und Small I** (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, **1541**(1-2):54–63
- Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ und Graham IA** (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol*, **15**(22):1998–2006
- Pfannschmidt T, Nilsson A und J A** (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, **397**:625–628
- Pokorny R, Klar T, Essen LO und Batschauer A** (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **61**(Pt 10):935–938
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A und Essen LO** (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(52):21023–21027

- Porra RJ** (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res*, **73**(1-3):149–156
- Precht J und Maier UG** (2001). Zoology meets Botany: establishing intracellular organelles by endosymbiosis. *Zoology (Jena)*, **104**(3-4):284–289
- Rehling P, Brandner K und Pfanner N** (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(7):519–530
- Ritz T, Adem S und Schulten K** (2000). A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys J*, **78**(2):707–718
- Ritz T, Wiltschko R, Hore PJ, Rodgers CT, Stapput K, Thalau P, Timmel CR und Wiltschko W** (2009). Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys J*, **96**(8):3451–3457
- Robinson C, Klösigen RB, Herrmann RG und Shackleton JB** (1993). Protein translocation across the thylakoid membrane—a tale of two mechanisms. *FEBS Lett*, **325**(1-2):67–69
- Robinson C, Thompson SJ und Woolhead C** (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic*, **2**(4):245–251
- Rogers SO und Bendich AJ** (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**:69–76
- Rosenfeldt G, Viana RM, Mootz HD, von Arnim AG und Batschauer A** (2008). Chemically induced and light-independent Cryptochrom Photoreceptor Activation. *Molecular Plant*, **1**:4–14
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K und Weisshaar B** (2003). An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol*, **53**(1-2):247–259
- Rösler J, Klein I und Zeidler M** (2007). Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(25):10737–10742
- Ruckle ME, DeMarco SM und Larkin RM** (2007). Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**(12):3944–3960
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M und Okada K** (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(12):6969–6974

- Sakai T, Wada T, Ishiguro S und Okada K** (2000). RPT2. A signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**(2):225–236
- Sakamoto K und Briggs WR** (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, **14**(8):1723–1735
- Sakamoto K und Nagatani A** (1996). Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J*, **10**(5):859–868
- Sancar A** (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev*, **103**(6):2203–2237
- Sang Y, Li QH, Rubio V, Zhang YC, Mao J, Deng XW und Yang HQ** (2005). N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell*, **17**(5):1569–1584
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA und Imaizumi T** (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science*, **318**(5848):261–265
- Schäfer E** (1977). *Optische Strahlungsquellen*, Kapitel Kunstlicht und Pflanzenzucht, Seiten 249–266. Lexica Verlag
- Schäfer E und Bowler C** (2002). Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep*, **3**(11):1042–1048
- Selby CP und Sancar A** (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(47):17696–17700
- Senger H** (1980). *The blue light syndrome*. Springer-Verlag, Berlin
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S und Nambara E** (2006). Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J*, **48**(3):354–366
- Seo M, Nambara E, Choi G und Yamaguchi S** (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol*, **69**(4):463–472
- Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC und Lin C** (2002). Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, **417**(6890):763–767
- Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T und Lin C** (2003). Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plant Cell*, **15**(10):2421–2429

- Sharrock RA und Clack T** (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(31):11500–11505
- Sharrock RA und Quail PH** (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev*, **3**(11):1745–1757
- Shiina T, Ishizaki Y, Yagi Y und Nakahira Y** (2009). Funktion und evolution of plastid sigma factors. *Plant Biotechnology*, **26**:57–66
- Shin J, Park E und Choi G** (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. *Plant J*, **49**(6):981–994
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J und Furuya M** (1994). The Induction of Seed Germination in Arabidopsis thaliana Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. *Plant Physiol*, **104**(2):363–371
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M und Furuya M** (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(15):8129–8133
- Small GD, Min B und Lefebvre PA** (1995). Characterization of a Chlamydomonas reinhardtii gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Mol Biol*, **28**(3):443–454
- Small I, Peeters N, Legeai F und Lurin C** (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**(6):1581–1590
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC und Smith AM** (2004). Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol*, **136**(1):2687–2699
- Soll J und Schleiff E** (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(3):198–208
- Somers DE** (2001). Clock-associated genes in Arabidopsis: a family affair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**(1415):1745–1753
- Somers DE, Devlin PF und Kay SA** (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science*, **282**(5393):1488–1490
- Somers DE, Kim WY und Geng R** (2004). The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell*, **16**(3):769–782

- Somerville C und Koornneef M** (2002). A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat Rev Genet*, **3**(11):883–889
- Sommer J** (unpublizierte Daten). Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Sondheimer E, Tzou DS und Galson EC** (1968). Abscissic Acid Levels and Seed Dormancy. *Plant Physiol*, **43**(9):1443–1447
- Song SH, Dick B, Penzkofer A, Pokorny R, Batschauer A und Essen LO** (2006). Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana. *J Photochem Photobiol B*, **85**(1):1–16
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F und Coupland G** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, **410**(6832):1116–1120
- Swartz TE, Corchnoy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR und Bogomolni RA** (2001). The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem*, **276**(39):36493–36500
- T Littlewood GE** (1998). *Helix-loop-helix Transcription Factors*. Oxford University Press
- Tamada T, Kitadokoro K, Higuchi Y, Inaka K, Yasui A, de Ruiter PE, Eker AP und Miki K** (1997). Crystal structure of DNA photolyase from Anacystis nidulans. *Nat Struct Biol*, **4**(11):887–891
- Tepperman JM, Hwang YS und Quail PH** (2006). phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant J*, **48**(5):728–742
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X und Quail PH** (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(16):9437–9442
- Thum KE, Kim M, Christopher DA und Mullet JE** (2001). Cryptochrome 1, cryptochrome 2, and phytochrome a co-activate the chloroplast psbD blue light-responsive promoter. *Plant Cell*, **13**(12):2747–2760
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE, Henikoff JG, Comai L und Henikoff S** (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res*, **13**(3):524–530
- Toledo-Ortiz G, Huq E und Quail PH** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, **15**(8):1749–1770

- Tsunoyama Y, Ishizaki Y, Morikawa K, Kobori M, Nakahira Y, Takeba G, Toyoshima Y und Shiina T** (2004). Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(9):3304–3309
- Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Adám E, Oakeley EJ, Schäfer E und Nagy F** (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(5):1397–1402
- Usami T, Matsushita T, Oka Y, Mochizuki N und Nagatani A** (2007). Roles for the N- and C-terminal domains of phytochrome B in interactions between phytochrome B and cryptochrome signaling cascades. *Plant Cell Physiol*, **48**(3):424–433
- Usami T, Mochizuki N, Kondo M, Nishimura M und Nagatani A** (2004). Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate Arabidopsis root greening under blue light. *Plant Cell Physiol*, **45**(12):1798–1808
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A und Coupland G** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, **303**(5660):1003–1006
- Vass I, Kirilovsky D, Perewoska I, Máté Z, Nagy F und Etienne AL** (2000). UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the psbA2 and psbA3 genes in the Cyanobacterium synechocystis sp. PCC 6803. *Eur J Biochem*, **267**(9):2640–2648
- Veluchamy S und Rollins JA** (2008). A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genet Biol*, **45**(9):1265–1276
- Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY und Deng XW** (2001). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, **294**(5540):154–158
- Weston E, Thorogood K, Vinti G und López-Juez E** (2000). Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in Arabidopsis thaliana wild type and blue-light-perception mutants. *Planta*, **211**(6):807–815
- Whippo CW und Hangarter RP** (2003). Second positive phototropism results from coordinated co-action of the phototropins and cryptochromes. *Plant Physiol*, **132**(3):1499–1507
- Wu G und Spalding EP** (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(47):18813–18818

- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA und Nagatani A** (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol*, **145**(3):437–445
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, Kamiya Y und Sun T** (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, **10**(12):2115–2126
- Yang HQ, Tang RH und Cashmore AR** (2001). The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, **13**(12):2573–2587
- Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, Liu D, Liu Y und Cashmore AR** (2000). The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, **103**(5):815–827
- Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW und Wang H** (2005). Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**(3):804–821
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J und Lin C** (2007). Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell*, **19**(10):3146–3156
- Zeugner A, Byrdin M, Bouly JP, Bakrim N, Giovani B, Brettel K und Ahmad M** (2005). Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *J Biol Chem*, **280**(20):19437–19440
- Zhang XN, Wu Y, Tobias JW, Brunk BP, Deitzer GF und Liu D** (2008). HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the cryptochrome 1-mediated early response to blue light in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, **3**(10):e3563
- Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD und Quail PH** (2000). Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(24):13419–13424

6 Anhang

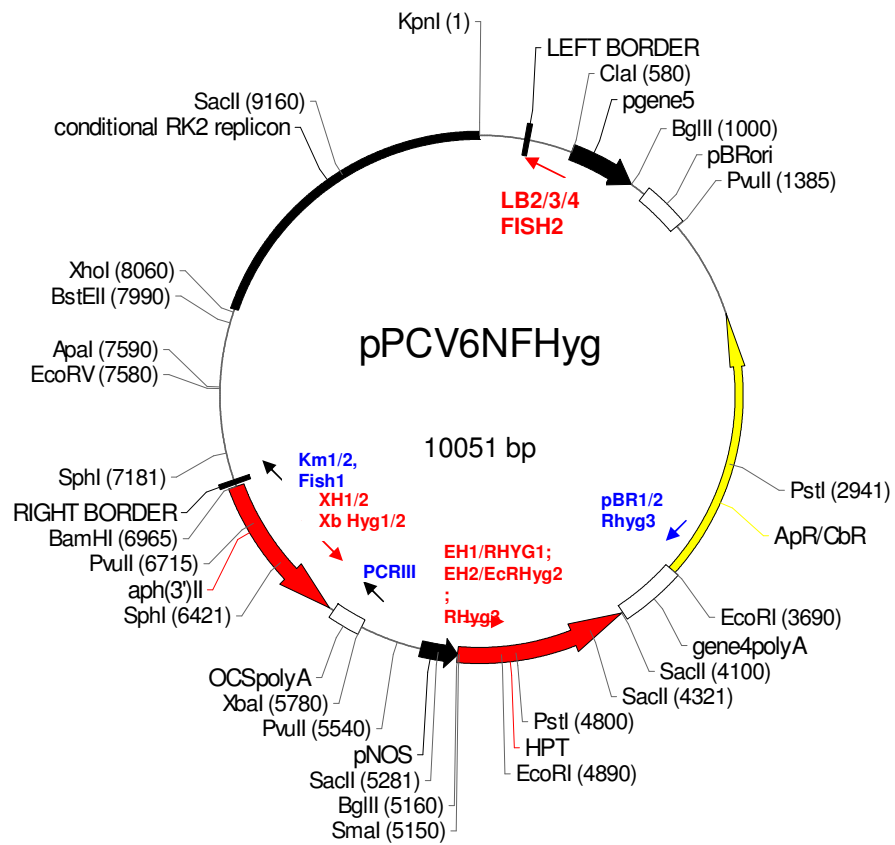


Abbildung 35: T-DNA Vektor pPCV6NFHyg. Dieser Vektor wurde für die T-DNA-Mutagenese der Csaba Koncz T-DNA-Linien verwendet.

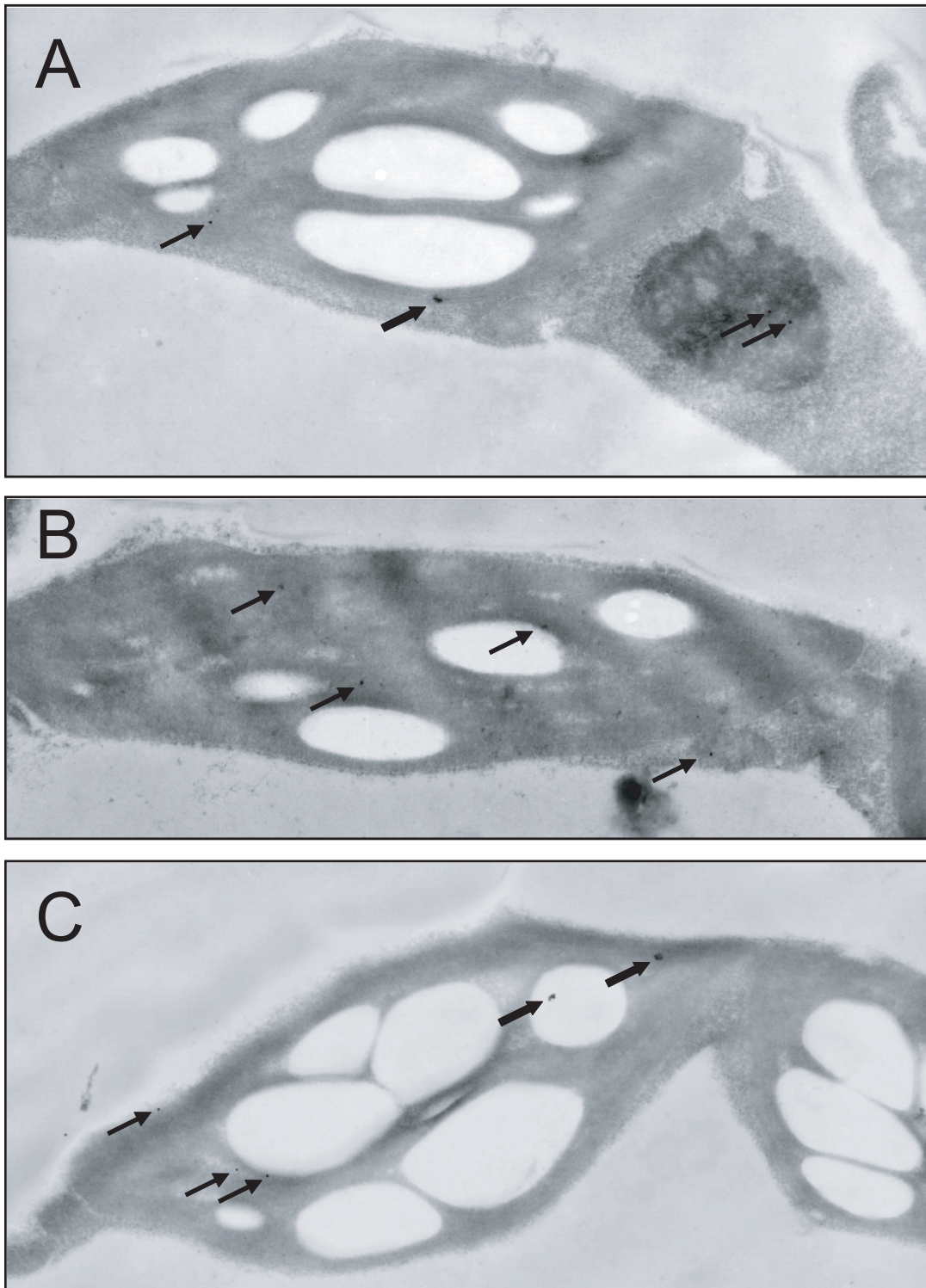


Abbildung 36: Lokalisation von cry3. Immunolokalisation von cry3 auf Ultradünnschnitten von Mesophyllzellen cry3-überexprimierender Pflanzen durch affinitätsgereinigten cry3-Antikörper. Die Goldpartikel sind als schwarze Punkte sichtbar und durch Pfeile zusätzlich gekennzeichnet. Cluster von mehreren Goldpartikeln sind durch dicke Pfeile markiert. (A) Nachweis von cry3 in einem Chloroplast und im Nukleolus. (B) Nachweis von cry3 in einem Chloroplast und Mitochondrium. (C) Nachweis von cry3 in einem Chloroplast.

A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
B	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	211	212	---	214	215	216	217	218	219	220
	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
C	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
D	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
E	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
F	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
G	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
H	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
I	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
J	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
	391	392	393	394	395	396	397	398	---	---

B										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
K	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
L	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
M	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
N	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
	921	922	923	924	925	---	---	---	---	---
	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
O	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
	731	732	733	734	735	736	737	738	739	---
	---	832	833	834	835	836	837	838	839	840
	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
P	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
Q	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
	---	562	563	564	565	566	567	568	569	570
R	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
	861	---	863	864	865	866	867	868	869	870
	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
S	671	672	---	674	675	676	677	678	679	680
	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880
	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
T	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
	781	782	---	784	---	786	787	788	789	790
	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
	---	---	---	---	---	---	---	---	399	400
	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800
	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900

C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
D	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
E	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
F	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
G	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
H	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
I	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
J	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Abbildung 37: Schema der Pflanzenpools für das screening der Koncz T-DNA-Kollektion. (A) *Screening* Schema für die ersten 400 Pools aus jeweils 100 Einzelpflanzen. Die DNA der Einzelpools ist in insgesamt 20 größere Pools aus jeweils 4000 Pflanzen zusammengefasst (1-10 und A-J). (B) *Screening* Schema der weiteren 500 Einzelpools. Die DNA ist in 20 größeren Pools aus jeweils 6000 Einzelpflanzen zusammengefasst (11-20 und K-T). (C) *Screening* Schema zur Identifikation der Einzelpflanzen mit der gesuchten Insertion aus dem entsprechenden 100er Pool.

```

ccaaagttattaagaagcatgtaatagtcgggtttatatataaaggatttggttttaaat 1020
ataggtctaagccataaaaaacacccaaaattctggaatcgaatcaacctaaaaataaaa 1080
gtctagtttggtattctaaaacatttggtttgcggttggttgatacgaaatctgaaat 1140
                                CRY3 upstream

ccgatacccgaaacaaatataccttaaattattattttattattgctactttttatcatgaaa 1200
caaatgaatttatgttactagaacaatgaactttttgtgtaattcggtccaaaaaccta 1260
accaaaataggtttcaattctatgtcggaaatgaaatttaaatttcgaaaaccgattcgaac 1320
ctgacaaaaccacaaatcgacctatatagatcataaatctccctatttgaattattccaaa 1380
tcggaaaaaacgatttgaaaaacctgaatgcctaaacctactttaaggttaaagaagcaa 1440
cagtagccataagaagaccacaaatataaagattgaaagaaccaactcgaaccaacaat 1500
gttcctaaaaatagaagccataaacctagatagagcccaaacccctaattcttcttcatc 1560
gacaacatgcaataaaactttgctcttgctcgtagatctctcgtccaagtccaaatttc 1620
tcataaagatgaagactattagagcatcattattgatgatctcttaaaccaattcttatt 1680
gttaagaaacatgtcttataactaacaaggctcttataaagagacattaaagtcactt 1740
ttggttagttataagacatatctcttaacataagagttatgttaagagaccatcaataact 1800
atgggtcttagtgacatttgagaagaggagcagccaaaagaaatttcagatcacatgttcga 1860
ttacaaactactaaaaatagagactgtagagtatagacTtattcacaacttggaaaaa 1920
agattaaagttgttttattataaagggtgaaaacttttgccaaataaaagcaataataatg 1980
tgtctcaaaaaaaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac 2040
gaataatccttaacattctctctcacataagcctttttgaattagacaaaaaaaaaaaaaa 2100
gcactagtccaagttttttttttttgtataacaaaaacagagacagatccagacaaaagg 2160
ctagacat LB T-DNA Insertion RB ccaccacgtcacgctt

cccaa LB T-DNA Insertion RB ccaagtga cacgtg cgcacccacaactcgt 2220
                                G-box

caaaacacaaacacccaaaaagtagatgacgttacaaagcatcatccgtaaATGGCGGCTT 2280
CCTCTCTCTCGTCTCTTCTCCTCTCTCAAACCCACTTCGCAGATTCACTCTTCACCATC 2340
TTCACCTCTCAAAGAAACCCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 2400
TGAACGACCATATCCACCGTGTTCGGGCTCTCACCGAGGAAGAGATTGACTCCGTCGCCA 2460 exon1
TAAAAACATTTGAGAGATACGCATTACCTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 2520
GAGTAACGATTTCTCTGGTTCAGAAACGATCTCAGAGTTCTTGACAATGACGCATGTGACA 2580
AAGCTTGGTCTTCTCTGATACCATTTGCTGTCTTACTGTCTCGATCCTCGTCTCTTTT 2640
ACACTACTCATTTCTTCAACTTCCCTAAAACCGGAGgtaatgtttccaatcataaaaaatc 2700
aatccctttttgtgatcttgatcactcaatccttgtgactatgttttcagCTTTAAGAGG 2760 exon2
CGGTTTTCTTATGGAATGTTGGTTGATTTGAGAAAGAATCTTATGAAACGAGGATTGAA 2820
TCTTCTTATTAGAAGTGGTAACACAGAAGAGATTCTTCTTCTCTTGTCTAAAGATTTTGG 2880
AGCTCGTACAgttaagttctgtttattgcttgtgttgaaagaaatttatcagagctttgtg 2940
agggaaatagaaaatgtgatttgtttgtttcttagGTTTTTGCGCATAAAGAAACGTGT 3000 exon3
AGTGAGGAGGTAGACGTTGAAAGACTTGTGAATCAAGGTTTGAAAAGGGTTGGAAATAGT 3060
ACTAAGCTTGAGCTCATTTGGGGAAGTACTATGTATCACAAGATGATCTTCTTTTGAT 3120
GTTTTTGACTTGCTGTATGTCTACACTCAGTTTCGTAAGgtaatgttcttgttttcggttg 3180
gtgtgtttcttgacacattaggagtgagtatatgaaatgctgaaaggtttatgatattta 3240
gtaccagaattttagtataccaaaactagatttatgtttattttgtttgataccaatgtt 3300

```

Abbildung 38: Sequenz T-DNA-Linie 26566 (5' T-DNA). Der Insertionsort der T-DNAs wurde durch Sequenzierung bestimmt. Die *CRY3*-Promotor-Sequenz zwischen den T-DNA-Insertionen wurde nicht bestimmt und kann möglicherweise von der Darstellung abweichen. Die kodierenden *CRY3*-Sequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt, die Intronsequenzen sowie die nichtkodierenden Sequenzen 5' des ATG Startcodons in Kleinbuchstaben. Die Sequenz des *upstream* Primers für das *screening* ist rot markiert.

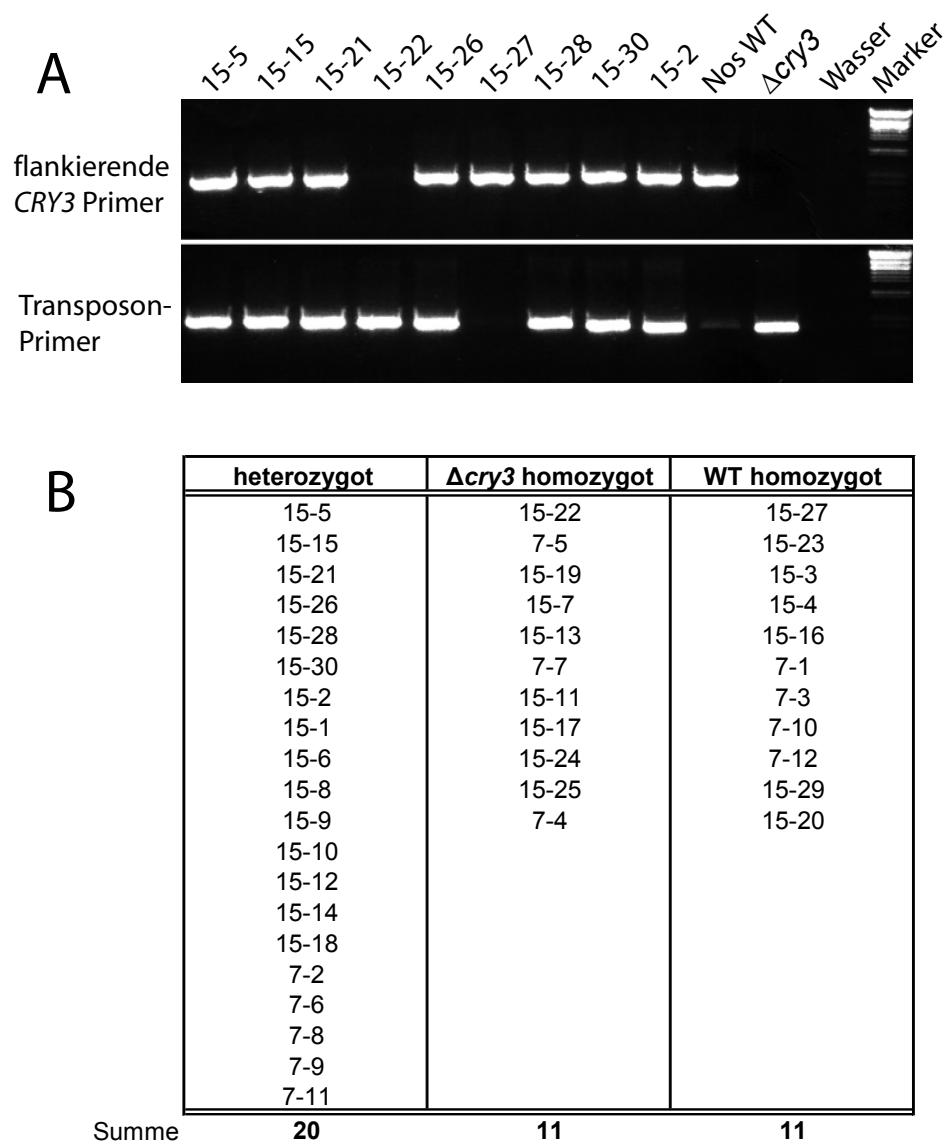


Abbildung 39: Segregation der *cry3*-Transposon-Linie. Die Anzahl der Transposon-Insertionen in der $\Delta cry3$ -Linie wurde durch eine molekulare Segregationsanalyse überprüft. Die DNA einzelner Pflanzen wurde durch eine PCR mit Transposon-flankierenden *CRY3*-Primern und Transposon-spezifischen Primern analysiert. (A) Exemplarische Analyse der PCR-Produkte einiger Linien durch Gelelektrophorese. (B) Tabellarische Darstellung der Segregations-Ergebnisse aller getesteten Linien.

Variant No.	Nucleotide Change	Effect	RE Gained in Variant	RE Lost from Reference	NASC Stock Nummer	Zygoty
1	C208T	F332=			N93986	Hetero
2	C292T	Intron			N96060	Hetero
3	G365A	R357K			N91047	Homo
4	C429T	Intron		BsmI	N91717	Hetero
5	C445T	Intron	MseI	AsuI,Avall	N91106	Hetero
6	G456A	Intron	MseI		N91059	Hetero
7	G456A	Intron	MseI		N93167	Hetero
8	C511T	L379F			N91015	Homo
9	G547A	G391S	DdeI	MaeI	N91372	Hetero
10	G547A	G391S	DdeI	MaeI	N91750	Homo
11	C614T	Intron		BsmI,Ksp632I	N93314	Homo
12	C741T	Intron			N94005	Hetero
13	G788A	Splice Junction	MseI		N93631	Hetero
14	C794T	P418L	MboII	BciVI,MnII	N94036	Hetero
15	G816A	K425=			N94031	Hetero
16	G858A	Q439=	TspEI		N95514	Homo
17	C869T	S443L			N96289	Hetero
18	G870A	S443=	TspDTI		N95576	Homo
19	C993T	Intron	TspDTI		N87074	Homo
20	C1089T	Intron			N93943	Hetero

Abbildung 40: Ergebnis der Tilling-Analyse von EMS-mutagenisierten Pflanzen. 20 Linien mit einer Punktmutation in *CRY3* wurden identifiziert. 5 dieser Mutationen führen zu einem Aminosäure-Austausch. 1 Linie enthält eine Mutation in einer *splicing* Erkennungssequenz. Bei den Linien die mit “=” gekennzeichnet sind, führt die Punktmutation nicht zu einem Aminosäureaustausch.

Genomic Sequence

<u>X V G G E S A G V G R V</u> F E Y F W K	309
tc gtt ggt ggt gaa agt gca gga gta ggc aga gta ttt gag tac ttt tgg aaa	53
K	310
aag gtaagaggataatgagctattcttgtgtttcttattggcggttgcttgtgtgtgtacataatgttgttt	124
<u>D L L K V Y K E T R N G M</u>	323
gtctctttttttcatgcag gat cta ttg aaa gta tac aaa gag acg agg aac gga atg	181
<u>L G P D Y S T K F S P W L A F G C I</u>	341
tta gga cct gat tat tcg acg aaa ttc tct cct tgg ctt gcc ttt ggg tgt atc	235
tF332= [1]	
<u>S P R F I Y E E</u>	349
tct cct cgt ttt atc tat gaa gag gtaaactctttcaaaacgtaattcgttaccccaaaacat	299
t[2]	
<u>V O R Y E K E</u>	356
atagcagtcctttcacttatgtgacaactgaaaaaatatttcag gtc caa aga tat gaa aag gaa	363
<u>R V A N N S T Y W</u>	365
aga gta gca aat aat tca aca tac tg gtatatcttcatatctgagtattgtatctctactgca	426
aR357K[3]	
<u>V L F E L I</u>	371
ttctctttactcttggctcctaattgattagatatatgtttccag g gta ctt ttt gaa cta ata	489
t[4] t[5] a[6] a[7]	
<u>W R D Y F R F L S I K C G N S L F H</u>	389
tgg aga gat tac ttc agg ttt ctt tca att aag tgt gga aac tca ctt ttt cat	543
tL379F [8]	
<u>L G</u>	391
cta g gtaactatgcttttgaattaaagctcaatgcaatgttgttacagtgaactttttaaatagcgcatt	613
aG391S [9]	
aG391S [10]	
<u>G P R N V O G K W S O D O K</u>	405
ctcttcgtag gt ggc ccg aga aat gtg caa ggg aag tgg agc caa gat cag aaa	667
t[11]	
<u>L F E S W R D A K T G</u>	416
cta ttt gag tct tgg aga gat gcc aag aca gg gtaattatttgatgttgtggtttttttt	728
<u>Y P</u>	418
ttgaaagatcaacaaagtaaagcttgtggaccttttagtgacttctcatgaatggtattag g tat cct	795
t[12] a [13] tP418L [14]	
<u>L I D A N M K E L S T T G F M S N R</u>	436
ctt ata gat gca aac atg aag gag tta tcc act aca ggt ttc atg tca aat cga	849
aK425= [15]	
<u>G R O I V C S F L V R D M G L D W R</u>	454
ggc cga cag att gtt tgt tcg ttt ctt gtc cgg gac atg ggg ttg gat tgg cgt	903
aQ439= [16] tS443L [17] aS443= [18]	
<u>M G A E W F E T C L L D Y D P C S N</u>	472
atg ggt gca gaa tgg ttt gag aca tgt cta tta gac tat gat cct tgt tct aat	957
<u>Y G N</u> W T Y G A G	481
tat gga aac tgg acc tat gga gca g gtaagtactactcatgacacagtttgtgacttgtggtt	1020
t[19]	
<u>V G N D P R E D R Y F S I P K O</u>	497
ttcaaattcaacattgagaatgagattgaaatgaaactttatagatggttgaaatctgtttttcttaccat	1092
t[20]	
tgaag ga gtt gga aat gat cca cgg gaa gac cgg tac ttc agc att ccc aag caa	1147

Abbildung 41: Sequenz-Analyse einiger Tilling-Linien

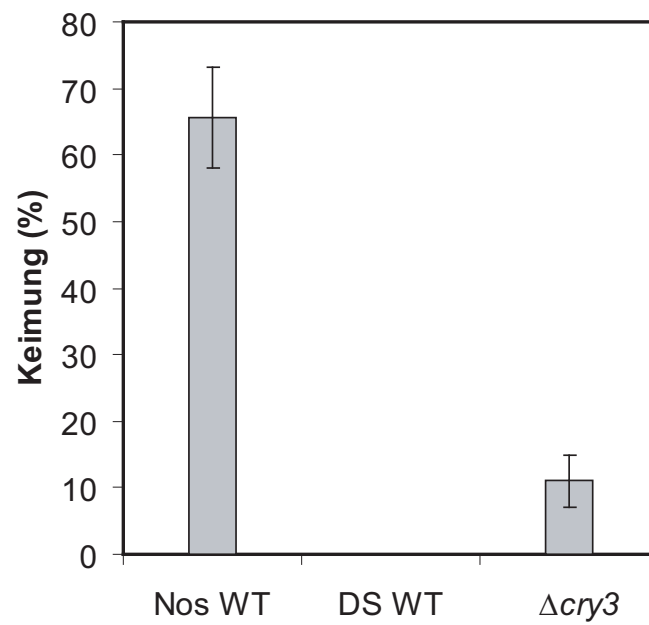


Abbildung 42: Keimung der DS-Parental-Linie. Die DS-Linie wurde ursprünglich zur Herstellung der Transposon-Insertionslinie verwendet. Zur Induktion der Keimung wurden die Samen für 5 min mit hellrotem Licht bestrahlt. Die Keimung wurde nach 4 Tagen Inkubation im Dunkeln bestimmt.

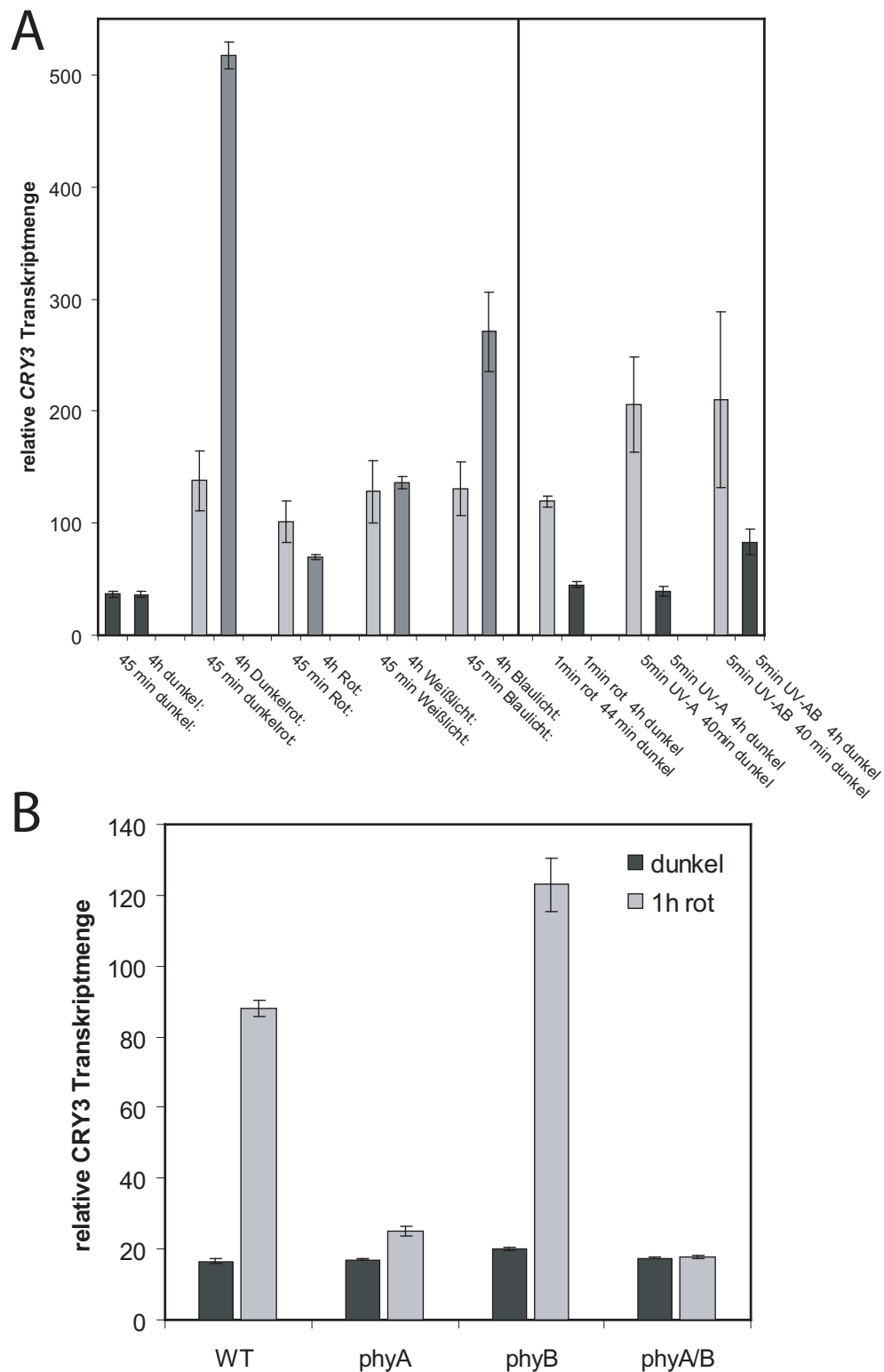


Abbildung 43: Microarray Analysen zur lichtabhängigen *CRY3*-Expression. (A) Daten von TAIR (- www.arabidopsis.org - Submission Number: ME00345). 4 Tage alte etiolierte *Arabidopsis* Keimlinge wurden mit jeweils $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dunkelrotem (715 nm), roten (650 nm), weißem und blauem (453 nm) Licht bestrahlt. (B) Analyse der *microarray* Daten von Tepperman et al. (2006).

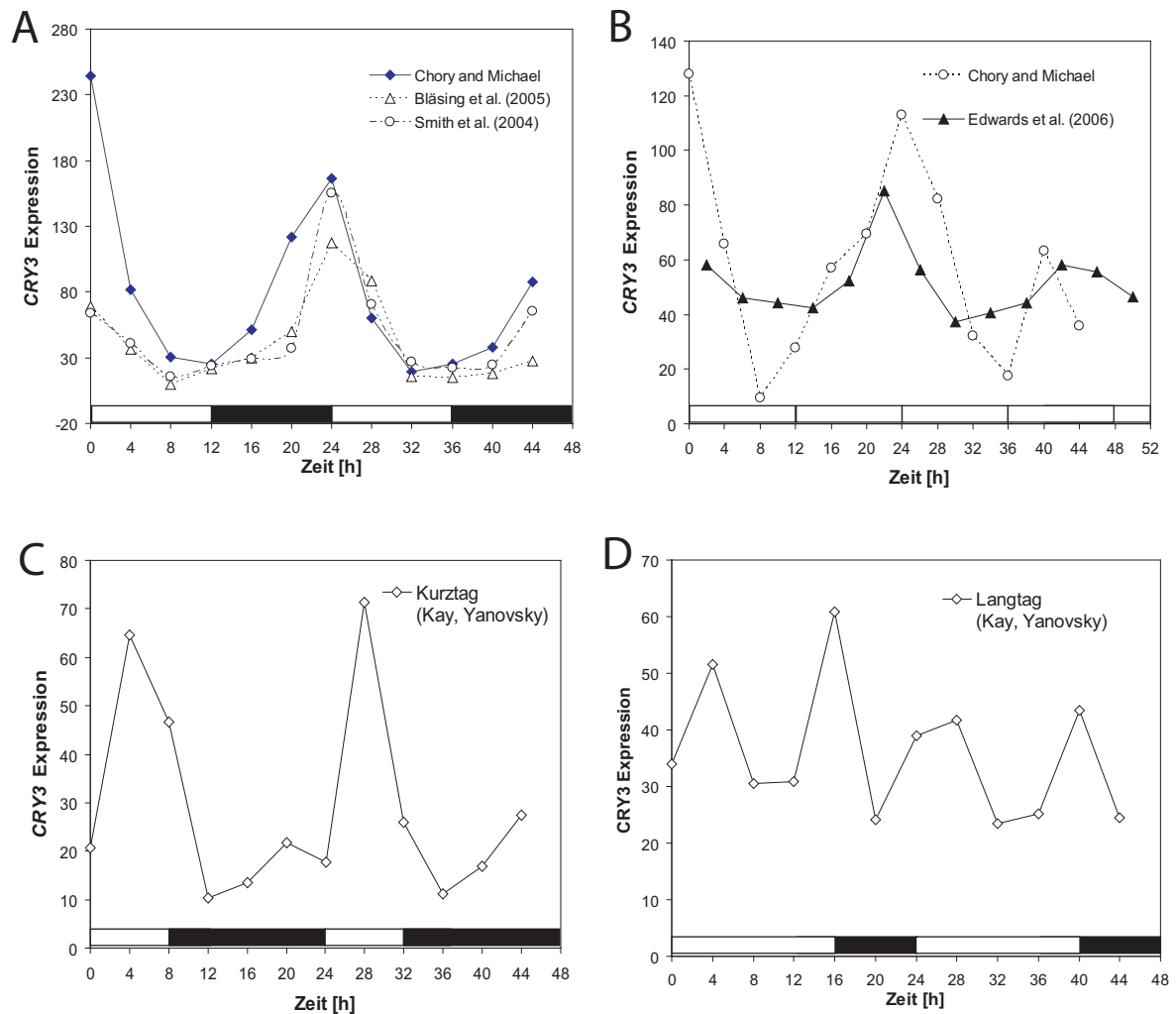


Abbildung 44: Microarray Analyse zur circadianen Rhythmik von *CRY3*. (A) Daten von Chory und Michael (Diurnal project, <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/> (Mockler et al., 2007)), Bläsing et al. (2005) und Smith et al. (2004). *CRY3*-mRNA-Expression in einem 12 h Licht/12 h Dunkel-Zyklus. Verwendet wurden jeweils 7 Tage (Chory und Michael), 35 Tage (Bläsing et al.) und 29 Tage (Smith et al.) alte Pflanzen. (B) Die Daten von Chory und Micheal (Diurnal project) und Edwards et al. (2006) zeigen den circadianen Rhythmus der *CRY3*-Expression im Dauer-Weißlicht. Die 9 bzw. 8 Tage alten Keimlinge waren zuvor in einem 12 h Licht/12 h Dunkel-Zyklus angezogen worden. (C-D) *CRY3*-Expression unter Kurztag- und Langtagbedingungen. Daten von Kay und Yanovsky (Diurnal Projekt). Es wurden dazu 7 Tage alte Keimlinge verwendet.

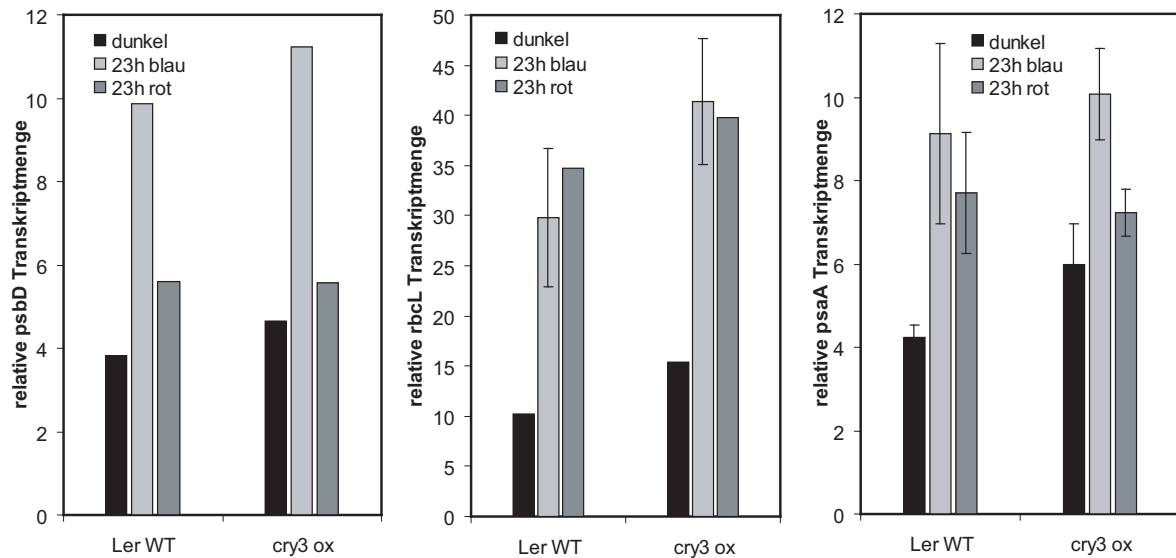


Abbildung 45: Induktion von Plastidentranskripten durch Blau- und Rotlicht. Die Induktion von *psbD*, *rbcL* und *psaA* wurde durch *realtime* PCR mit UBQ als Referenzgen bestimmt. Die Werte ohne Fehlerbalken wurden nicht mehrfach bestimmt.

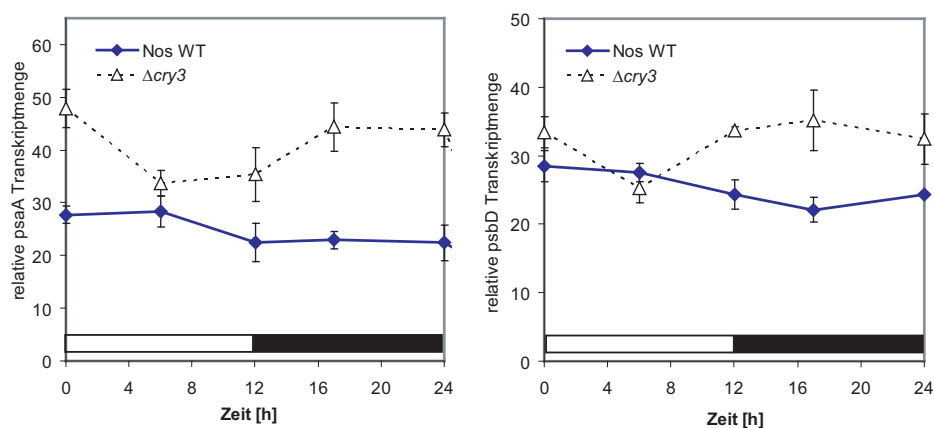


Abbildung 46: Diurnale Gen-Expression in Plastiden. Die Expression der *psaA*- und *psbD*-Transkripte im 12h Licht/12h Dunkel-Zyklus beim WT und der $\Delta cry3$ -Mutante wurden durch *realtime* PCR mit UBQ als Referenzgen bestimmt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft während meiner Promotion danken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Julia Sommer und Elvira Stumpf sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Batschauer für die angenehme und entspannte Laboratmosphäre. Oxana Panajotowa danke ich für ihre Unterstützung bei der Klonierung und der Transformation der CRY3-RNAi und -Überexpressionslinien.

Agnes Debelius danke ich für die gute Pflege der Pflanzen und Zellkulturen, ohne die meine Versuche nicht möglich gewesen wären. Danke an Marianne Johannsen aus der AG Maier für die Arbeiten am Elektronenmikroskop.

Der Arbeitsgruppe Dr. Csaba Koncz und vor allem Sabine Schäfer danke ich für die Unterstützung beim T-DNA Screening am MPIZ in Köln.

Ich danke Dr. Steven Penfield von der University of York für seine Hilfe bei der Durchführung der Keimungsversuche.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Regina Reisbacher für ihre Unterstützung während der letzten Jahre und für die Korrektur dieser Arbeit. Danke auch an meine Tochter Alina dafür, dass Du da bist und mich immer wieder zum Lachen bringst. DANKE!

Lebenslauf

Name

Stefan Reisbacher (geb. Meier)

Geburtsdaten

23.08.1978 in Salzkotten

Familienstand

verheiratet
1 Tochter (geb. 09/2008)

Schulbildung

08/1985 – 07/1989: Grundschule Haaren / Helmern

08/1989 – 05/1998: Liebfrauen-Gymnasium, Büren
Abschluss: Abitur

Wehrdienst

07/1998 – 04/1999: Rommelkaserne, Augustdorf

Studium

10/1999 – 09/2004: Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

10/2003 Diplomprüfung Biologie in den
Fächern Pflanzenphysiologie, Genetik
und Mikrobiologie

11/2003 – 08/2004 Diplomarbeit in der AG Batschauer
zum Thema „Untersuchungen zur
Expression und Lokalisation von
Cryptochrom 3 aus Arabidopsis thaliana“

Promotion

09/2004 – 08/2009 Promotion in der Arbeitsgruppe Batschauer
Philipps-Universität Marburg

Thema der Promotion:
„Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3
aus Arabidopsis thaliana“

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

“Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana*“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, _____
